

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

ESTUDIO MOLECULAR DE LOS FACTORES DE  
VIRULENCIA Y DE LA RESISTENCIA A  
CLARITROMICINA EN LA INFECCIÓN POR  
*Helicobacter pylori*.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

SONIA AGUDO PENA

**Madrid, 2010**

ISBN: 978-84-693-7739-0

© Sonia Agudo Pena, 2010

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Microbiología**

ESTUDIO MOLECULAR DE LOS FACTORES DE  
VIRULENCIA Y DE LA RESISTENCIA A  
CLARITROMICINA EN LA INFECCIÓN POR

*Helicobacter pylori.*

TESIS DOCTORAL

SONIA AGUDO PENA

Madrid 2010

## Agradecimientos

---

A mis padres

A Carlos

A Álvaro

## Agradecimientos

---

Al Dr. M. López-Brea por la confianza que ha depositado en mis ideas y en mi trabajo. Por haberme inculcado la mentalidad de que se puede ser cada vez mejor en lo que uno hace. Gracias por el ejemplo, la confianza y el apoyo que me ha brindado desde el primer día.

A la Dra. Teresa Alarcón porque sin su ayuda este trabajo nunca hubiera llegado a su fin. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha supuesto una ayuda imprescindible, no sólo en la realización de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Gracias por haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo todas las actividades propuestas en el desarrollo de esta tesis. No puedo olvidar tu paciencia, tu optimismo y tu absoluta disponibilidad para ayudarme tanto profesional como personalmente todos los días del año.

Al Dr. Diego Domingo por su valiosa colaboración en este trabajo, por sus palabras de aliento. Deseo algún día poder ser tan buen profesional como tú, pero sobre todo tan buena persona.

Al Dr. Guillermo Pérez-Pérez por convertir Nueva York en una ciudad pequeña y acogedora, pero sobre todo por saberme transmitir la pasión por el mundo de la investigación.

A todos los facultativos y residentes del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa por todo lo que he aprendido de cada uno de ellos, por su apoyo, cariño y comprensión.

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1 <u>CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Helicobacter pylori</i>.</u></b>	2
1.1.1 Historia.	2
1.1.2 Ultraestructura.	4
1.1.3 Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> .	6
<b>1.2 <u>FACTORES DE PATOGENICIDAD DE <i>H. pylori</i>.</u></b>	7
1.2.1 Factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica.	8
1.2.2 Factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica.	13
1.2.3 Otros factores.	20
<b>1.3 <u>CLÍNICA DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR <i>H. pylori</i>.</u></b>	22
1.3.1 Manifestaciones digestivas.	22
1.3.2 Manifestaciones extradigestivas.	25
<b>1.4 <u>EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>.</u></b>	27
<b>1.5 <u>MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>.</u></b>	30
1.5.1 Métodos invasivos.	31
1.5.2 Métodos no invasivos.	34

<b>1.6 <u>TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>.</u></b>	<b>37</b>
1.6.1 Pautas de tratamiento.	38
1.6.2 Antiácidos utilizados para erradicar <i>H. pylori</i>	39
1.6.3 Antimicrobianos utilizados para erradicar <i>H. pylori</i> .	40
1.6.4 Causas de fracaso del tratamiento.	46
1.6.5. Métodos de detección de resistencia.	47
<b>1.7 <u>VARIACIÓN GEOGRAFICA DE LAS CEPAS.</u></b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS.</b>	<b>52</b>
<b>3. MÉTODOS.</b>	<b>53</b>
<b>3.1 <u>PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.</u></b>	<b>54</b>
3.1.1 Estudio de biopsia gástrica mediante PCR a tiempo real.	54
3.1.2 Estudio de biopsia gástrica mediante PCR e hibridación en tiras de nitrocelulosa.	54
3.1.3 Estudio de resistencia a claritromicina y su asociación con los factores de virulencia en aislamientos clínicos de <i>Helicobacter pylori</i> en el año 2008.	54
3.1.4 Estudio de factores de virulencia de aislamientos clínicos de <i>Helicobacter pylori</i> en el año 1994.	55
<b>3.2 <u>TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.</u></b>	<b>56</b>

<b>3.3 <u>PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.</u></b>	
3.3.1 Cultivo de la biopsia gástrica.	56
3.3.2 Extracción de DNA cromosómico a partir de la biopsia gástrica o a partir de cepas del año 2008.	57
3.3.3 Extracción de DNA cromosómico a partir de cepas en el año 1994.	59
<b>3.4 <u>ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD <i>in vitro</i>.</u></b>	60
3.4.1 Difusión en placa con disco y E-test.	60
3.4.2 Puntos de corte utilizados.	60
3.4.3 Método genotípico para la detección de resistencia a claritromicina mediante PCR en tiempo real (Light Cycler) a partir de biopsia gástrica.	61
3.4.4 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante PCR e hibridación con sondas específicas a partir de biopsia gástrica.	62
3.4.5 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante secuenciación.	65
3.4.6 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante PCR convencional con un producto amplificado mayor.	67
3.4.7 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante RFLP-PCR con enzimas de restricción.	68
3.4.7.1 Digestión con la enzima de restricción <i>BsaI</i> .	69
<b>3.5. <u>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA.</u></b>	70
3.5.1 Detección del gen <i>vacA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .	70

3.5.1.1	Región <i>s</i> y <i>m</i> .	70
3.5.1.2	Región <i>i</i> .	71
3.5.2	Detección del gen <i>cagA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .	72
3.6	<b><u>ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES INFORMATIVOS DE</u></b> <b><u><i>Helicobacter pylori</i> Y SU RELACIÓN CON LA PROCEDENCIA</u></b> <b><u>GEOGRÁFICA.</u></b>	75
3.6.1	Detección del gen <i>HspA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> .	75
3.6.2	Detección de la presencia de <i>ins180</i> pb.	76
3.7	<b><u>MLST (Multi Locus Sequence Typing)</u></b>	78
3.8	<b><u>DETECCIÓN DE LOS RESULTADOS.</u></b>	80
3.9	<b><u>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.</u></b>	80
4.	<b>RESULTADOS.</b>	81
4.1	<b><u>PCR A TIEMPO REAL EN MUESTRAS DE BIOPSIAS</u></b> <b><u>GÁSTRICAS.</u></b>	82
4.1.1	Detección de resistencia a claritromicina mediante PCR a tiempo real.	83



<b>4.2 <u>TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN E HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS A PARTIR DE BIOPSIA GÁSTRICA.</u></b>	<b>88</b>
4.2.1 Detección de resistencia a claritromicina mediante PCR convencional y posterior hibridación.	90
<b>4.3 <u>ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DE CEPAS DE <i>Helicobacter pylori</i> EN MADRID 2008.</u></b>	<b>93</b>
4.3.1 Datos de sensibilidad a claritromicina.	93
4.3.2 Sensibilidad a claritromicina.	96
4.3.2.1 Detección de la mutación responsable de la resistencia a claritromicina.	97
4.3.2.2 Secuenciación de 695 pares de bases de la región 23S RNA para detectar resistencia a claritromicina en las cepas que hubo discrepancia entre el método fenotípico y el genotípico.	98
4.3.2.3 RFLP (restriction fragment length polymorphism technique).	99
4.3.2.4 Relación de la resistencia a claritromicina con factores del paciente.	101
4.3.2.4.1 Relación entre la edad y la sensibilidad a claritromicina.	101
4.3.2.4.2 Relación entre el lugar de nacimiento y la sensibilidad a claritromicina.	101
4.3.2.4.3 Relación entre el tratamiento previo frente a <i>H. pylori</i> y la sensibilidad a claritromicina.	102
4.3.2.4.4 Relación entre el género y la sensibilidad a claritromicina.	102
4.3.3 Datos globales de la detección de genes asociados a la virulencia.	104

4.3.3.1	Detección del gen <i>cagA</i> .	107
4.3.3.1.1	Detección del número y tipos de fosforilación EPIYA motifs.	109
4.3.3.2	Detección de los alelos del gen <i>vacA</i> .	112
4.3.3.2.1	Detección de la región m y s.	112
4.3.3.2.2	Relación entre los alelos del gen <i>vacA</i> y el lugar de nacimiento del paciente.	114
4.3.3.2.3	Relación entre los alelos del gen <i>vacA</i> y la edad del paciente.	114
4.3.3.2.4	Detección de la región intermedia del gen <i>vacA</i> .	115
4.3.3.3	Relación entre el gen <i>cagA</i> y <i>vacA</i> .	117
4.3.3.4	Relación entre los genes <i>cagA</i> y <i>vacA</i> y la resistencia a claritromicina.	117
4.3.4	Estudio de la presencia de genes informativos con la procedencia geográfica de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> .	119
4.3.4.1	Detección de la presencia <i>ins180</i> bp.	119
4.3.5	MLST (Multi Locus Sequence Typing).	120
4.4	<b><u>ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DE CEPAS DE <i>Helicobacter pylori</i> EN ESPAÑA 1994.</u></b>	121
4.4.1	Datos de los pacientes.	121
4.4.2	Sensibilidad a claritromicina.	123
4.4.2.1	Detección de la mutación responsable de la resistencia a claritromicina.	125
4.4.3	Datos globales de la detección de genes asociados a la virulencia.	126
4.4.3.1	Detección del gen <i>cagA</i> .	128

4.4.3.2	Detección de las distintas combinaciones alélicas del gen <i>vacA</i> .	130
4.4.3.3	Determinación de la región intermedia del gen <i>vacA</i> .	131
4.4.3.4	Relación entre el gen <i>vacA</i> y gen <i>cagA</i> .	132
4.4.4	Estudio de la presencia de genes informativos con la procedencia geográfica de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i> .	134
4.4.4.1	Detección de la presencia <i>ins180</i> pb.	134
4.4.4.2	HspA (Heat Shock Protein).	135
4.5	<b><u>RELACIÓN ENTRE LAS CEPAS AISLADAS EN 2008 Y EN 1994.</u></b>	137
4.5.1	Cambio de sensibilidad a claritromicina en los dos períodos de tiempo.	138
4.5.2.1	Cambios en el gen <i>vacA</i> .	138
4.5.2.2	Cambios en el gen <i>cagA</i> .	138
4.5.2.2.1	Comparación de los motivos de fosforilación EPIYA.	139

## 5. DISCUSIÓN.

5.1	Diagnóstico de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y su sensibilidad a claritromicina mediante técnicas de biología molecular: PCR a tiempo real y PCR convencional con hibridación reversa.	141
5.2	Estudio de la sensibilidad a claritromicina.	148
5.3	Estudio del gen <i>cagA</i> .	154
5.4	Estudio del gen <i>vacA</i> .	159
5.5	Relación del gen <i>cagA/vacA</i> .	162

<b>5.6 Estudio de la inserción de 180 pares de bases.</b>	163
<b>5.7 Estudio del gen <i>hspA</i>.</b>	164
<b>5.8 Estudio MLST.</b>	165

<b>6. CONCLUSIONES.</b>	166
-------------------------	-----

<b>7. BIBLIOGRAFÍA.</b>	169
-------------------------	-----

## Agradecimientos

---

Al personal técnico y administrativo del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario la Princesa por su constante interés.

A mis amigos porque me han enseñado el verdadero significado de la amistad, valor muy importante en mi vida.

A Álvaro por su apoyo incondicional y sus dosis de paciencia. Gracias por tus consejos y por haberme permitido compartir risas y llantos todo este tiempo.

A Carlos por su ayuda, paciencia y generosidad. Gracias por hacerme reír.

Finalmente quiero agradecer a mis padres por estar conmigo incondicionalmente, por ayudarme en todo lo que necesito; por ser un ejemplo de lucha y honestidad. Gracias porque sin vosotros y vuestras palabras de aliento no estaría aquí hoy ni sería quien soy ahora.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Helicobacter pylori*.

### 1.1.1 Historia

La mayoría de las infecciones bacterianas del hombre se describieron a comienzos del siglo XX, por ello es extraordinario que el descubrimiento de *Helicobacter* como bacteria de gran importancia en medicina, se retrasara hasta los años ochenta. Cuando en el año 1981 Marshall y Warren inician un estudio prospectivo en pacientes que acuden a consulta para ser sometidos a endoscopia oral, seguramente no eran conscientes de la revolución que iban a originar en el mundo de la Medicina. Hasta entonces si a alguien se le hubiera ocurrido decir que las úlceras gastroduodenales podían ser curadas con tratamiento antibiótico, le habrían tachado de loco. En ese trabajo, realizado en el Royal Perth Hospital de Australia, lograron visualizar bacterias helicoidales en la superficie de la mucosa gástrica en el 98 % de las gastritis crónicas y en el 80 % de los pacientes con úlcera gástrica, utilizando la tinción de plata de Warthin-Starry (Warren 1983, Marshall 1984a).

Pero la visualización de las bacterias espirales en el estómago no era algo nuevo. Las primeras descripciones se remontan a finales del siglo XIX, habiendo sido descritas en estómagos de perros y gatos (Rappin 1881, Bizzozero 1893). Tras confirmar dichos hallazgos en animales, Salomon buscó las bacterias helicoidales en estómagos humanos donde también las observó (Salomon 1896). Aunque fue Jaworski el primero que sugirió un posible papel patógeno en la enfermedad gástrica (Jaworski 1899). Resulta curioso que, a pesar de que en 1906 Krienitz encontrara estos organismos en pacientes con cáncer gástrico (Krienitz 1906), sea difícil encontrar referencias bibliográficas hasta 1938,

siendo un estudio que podría haber despertado una gran curiosidad científica al apoyar la hipótesis patógena. Ese año, Doenges realiza el primer estudio sistemático en busca de las bacterias helicoidales en estómagos humanos (Doenges 1938). Un año más tarde, Freedberg y Berron consiguen relacionar estos microorganismos con las úlceras gástricas, habiendo observado este tipo de bacterias helicoidales en un porcentaje similar de muestras que poseían patología gástrica (Freedberg 1940). Pero esta controversia existente sobre la teoría infecciosa de la patología gastroduodenal pareció quedar supuestamente zanjada cuando en el año 1954 Palmer realiza un meticuloso estudio en más de 1100 biopsias gástricas y no encontró evidencia de bacterias espirales en ninguna de ellas (Palmer 1954). Desde entonces quedó asumida la idea de que el estómago era un órgano estéril y que las bacterias vistas en biopsias eran fruto de la contaminación microbiana de la boca.

Tuvieron que pasar más de 20 años para que se volviera a sugerir la posibilidad de que la infiltración leucocitaria en la enfermedad ulcerosa se debía a una bacteria. Steer y Colin Jones en 1975, al estudiar muestras de pacientes con úlcera gástrica, observaron con microscopía electrónica la existencia de microorganismos espirales en la mucosa gástrica asociados a respuesta inflamatoria (Steer 1975).

Y es aquí donde volvemos a encontrarnos con Marshall, Warren y Goodwin. Como hemos podido comprobar, el hecho de observar bacterias curvadas en secciones histológicas de biopsias gástricas de enfermos de gastritis no era algo nuevo. Lo que sí marcaría un hito en la historia de la Microbiología es que por primera vez y tras varios intentos fallidos lograron cultivar la bacteria helicoidal de biopsias de antro gástrico siguiendo la metodología descrita por Skirrow para el aislamiento de *Campylobacter* spp



(Skirrow 1977). Pero en vez de incubar las placas las 48 horas propuestas por Skirrow permanecieron siete días incubándose al coincidir con el periodo vacacional de Semana Santa. En un principio Marshall sugiere que podrían pertenecer al género *Spirillum* proponiendo posteriormente el nombre formal de *Campylobacter pyloridis* siendo revisado en 1987 para adaptarse a las formas gramaticales latinas correctas y apareciendo en las publicaciones científicas como *Campylobacter pylori* (Marshall 1987).

Posteriormente estudios de secuenciación de la región 16S del RNA ribosómico demostraron que la especie denominada *Campylobacter pylori* era distinta de las especies de *Campylobacter* descritas hasta entonces. En 1989 se adoptó la nueva denominación de *Helicobacter*, pasando a denominarse *Helicobacter pylori* (Goodwin 1989).

En España el primer trabajo donde se describe el aislamiento de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal se publicó en 1985 (López-Brea 1985). Ese mismo año Marshall demuestra que dicho microorganismo cumple los postulados de Koch al ingerir el microorganismo induciéndose una gastritis hecho repetido por Morris (Morris 1987).

### **1.1.2 Ultraestructura.**

El genero *Helicobacter* junto con *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* y *Wollinella* forma parte de la clase *Epsilonbacteria* en la subdivisión *Thiobacteria* de la división *Proteobacteria* (Cavalier-Smith 2002).

El género fue propuesto por primera vez en 1989 e incluyó a las especies *Helicobacter pylori* y *Helicobacter mustelae*, primeras bacterias aisladas de la mucosa

gástrica humana y de los hurones, respectivamente (Goodwin 1989). La consecuente revisión de géneros próximos llevó a la inclusión de *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*, que habían estado incluidas también en *Campylobacter*.

*H. pylori* es un bacilo gramnegativo, curvado y microaerofílico que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano. *H. pylori* tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales, esta forma se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a situaciones no favorables para su crecimiento adoptando forma cocoide. Presenta un tamaño de 0,5 a 1,0 micras de ancho y de 3 micras de largo. Tiene de 2 a 6 flagelos monopolares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación del medio ácido (Amieva 2008).

Su temperatura óptima de crecimiento se produce a 37 °C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35 a 39 °C en microaerofilia, y para su cultivo se requieren medios suplementados con suero o sangre entre el 5% y 10%, los cuales pueden actuar como fuentes adicionales de nutrientes y la protegen de efectos tóxicos de los ácidos grasos de cadena larga. El efecto de estos ácidos grasos también puede ser evitado por la adición de suplementos como  $\beta$ -ciclodextrinas, IsoVitaleX o por la adición de carbón activado en el medio de cultivo (Mégraud 1995).

Las especies de *Helicobacter* son quimioorganotrofas y tienen un metabolismo respiratorio. Son asacarolíticas (no hay fermentación ni oxidación de azúcares) aunque si

ocurre la oxidación de glucosa. Tienen, al menos parcialmente, las vías metabólicas Entner-Doudoroff, de pentosas fosfato, y el ciclo de ácidos tricarboxílicos, pero la vía del glioxilato está ausente. No hidrolizan gelatina, almidón, caseína o tirosina, son rojo de metilo y Voges-Proskauer negativos. La actividad de oxidasa, ureasa y catalasa está presente en *Helicobacter pylori*, enzimas muy útiles para su identificación.

Aunque *H. pylori* es muy homogéneo en cuanto a sus características bioquímicas, presenta una importantísima variabilidad antigénica. Esto es debido a que existen muchos genes que codifican proteínas de membrana y además entre ellas pueden darse distintos procesos de recombinación.

### **1.1.3 Cultivo de *Helicobacter pylori*.**

*Helicobacter pylori* es un microorganismo capaz de crecer en distintos medios de cultivo si bien requiere diferentes factores de crecimiento. Los medios de cultivo sólidos más frecuentes son Agar Mueller-Hinton y Agar Columbia y los suplementos más comúnmente empleados son la sangre o derivados de ella. Es difícil de cultivar en medio líquido aunque se logra con menor dificultad a partir de caldo de *Brucella*, infusión cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con nutrientes (Mégraud 1997).

Para el aislamiento primario, con el objetivo de evitar el sobrecrecimiento de contaminantes que pueden acompañar a *H. pylori* en la biopsia es necesaria la utilización de inhibidores que no afecten su viabilidad. Es recomendable añadir mezclas de

antibióticos como el suplemento de Dent, que contiene vancomicina, trimetoprim, cefsoludina y anfotericina B.

*H. pylori* es un microorganismo microaerófilico que requiere para su crecimiento una atmósfera con las siguientes características: 5-10% de O<sub>2</sub>, 5-10% de CO<sub>2</sub> y 80-90% de N<sub>2</sub> a 35-37°C, una humedad del 90-95% y una incubación de hasta 10 días antes de considerar negativo el cultivo.

## **1.2 FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *H. pylori*.**

La infección por *Helicobacter pylori* origina prácticamente siempre gastritis crónica. Sin embargo, las complicaciones principales (úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico) se desarrollan solo en una minoría de personas infectadas, predominantemente en hospedadores adultos.

Uno de los retos de la investigación de *H. pylori* es la identificación de los factores de virulencia predictivos de la progresión de la infección. Se han propuesto varios factores de virulencia como *cagA*, *vacA* y *babA*, entre otros. Aunque se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad ulcerosa péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, ninguno de ellos implica por si mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto. Esta asociación aumenta cuantos más factores de virulencia acumula una bacteria (Wen 2009).

Los factores de virulencia son productos bacterianos o estrategias que contribuyen a la patogenicidad. Las bacterias necesitan penetrar en el organismo hasta llegar a la zona donde van a persistir y producir su efecto patógeno.

*H. pylori* origina una fuerte respuesta inmune, humoral y celular en la mucosa gástrica; aunque con esto no consigue eliminar la infección y se producen daños en el epitelio gástrico. Tras la colonización, *H. pylori* libera sustancias tóxicas que estimulan la respuesta inmunológica local en la que fundamentalmente participan los neutrófilos. Después se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides y células no inmunes que liberan gran cantidad de mediadores químicos. La úlcera péptica, el adenocarcinoma y el linfoma gástrico son complicaciones de esta inflamación crónica (Allen 2008).

### **1.2.1 Factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica.**

*H. pylori* posee factores de virulencia que ayudan a la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales.

- **UREASA:** la ureasa es la enzima mas abundante producida por *H. pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *H. pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad (Bauerfeind 1997). El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante

la colonización o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataboliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 ó 7 en su entorno. De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro.

La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al  $\text{NH}_4^+$  producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador *UreI* permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva.

El  $\text{NH}_4^+$  liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. Origina una necrotización del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.

- **SISTEMAS ANTIOXIDANTES:** *H. pylori* es una bacteria microaerofílica vulnerable a la toxicidad de  $\text{O}_2$ . Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno están

la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrogeno; la catalasa o peroxidasa, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes y la flavo proteína *MdaB*, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes. Además, el sistema tiorredoxina cataliza los procesos de oxidación-reducción, tiol dependientes, de un gran número de enzimas detoxificadoras. La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxirredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas.

A veces los sistemas de detoxificación no son suficientes y puede existir oxidación. Para ello *H. pylori* cuenta con un mecanismo para reparar el DNA dañado, como las proteínas *RecA*, *UvrABC*, endonucleasa III, *MutS* y *RuvC*.

La proteína NAP (Neutrophil activating protein), codificada por el gen *napA*, fue identificada primeramente como una proteína que participa en la activación de los neutrófilos. Tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el DNA de *H. pylori* y protege a *H. pylori* del estrés oxidativo. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o se expresa en la superficie bacteriana pues tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares y por el grupo antigénico sanguíneo de Lewis (Long 2009).

- **FLAGELOS:** la gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica, según se ha deducido de la infección experimental de animales con variantes de *H. pylori* aflageladas y por tanto no móviles. *H. pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares, característica inusual que es distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homo poliméricas. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, *FlaA* y *FlaB*. *FlaB* se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante *FlaA*, se encuentra en el exterior. La eliminación de ambas flagelinas da como resultado la pérdida de la movilidad, que sin embargo conservan una capacidad de adherencia similar a la de tipo silvestre. Además la morfología espiral o helicoidal facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, y la bacteria produce una proteasa que digiere el moco facilitando su avance.

- **ADHESINAS:** *H. pylori* se une a las células receptoras del huésped, estas son células epiteliales gástricas, a las que se une de una forma específica mediante un elevado número de adhesinas utilizando múltiples receptores. Entre ellos hay glicerofosfolípidos, sulfátidos, componentes de la matriz extracelular y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina o de glicoconjugados. Una sola clase de anticuerpos no inhibe por completo la adhesión de la bacteria a las células, por lo que se considera que la adherencia de *H. pylori* se realiza a través de múltiples adhesinas y receptores al mismo tiempo (Beswick 2006).

- **HpaA** (*Helicobacter pylori* adhesin A): la proteína HpaA es una de las principales proteínas de la membrana externa de *H. pylori* y, al igual que



muchas de ellas actúa como adhesina. HpaA media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuraminil-lactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la de los neutrófilos. Está codificada por el gen *hpaA*. Es un antígeno de membrana que es reconocido por los anticuerpos humanos por lo que puede ser usado en los ensayos serológicos y para las vacunas. Se ha visto que es reconocida por las células presentadoras de antígeno humanas estimulando la proliferación de los linfocitos T y B (Nvström 2007).

- **BabA** (blood antigen binding adhesion): los antígenos de Lewis son antígenos fucosilados de grupo sanguíneo (Wirth 1999). Son expresados, además de por los eritrocitos, por células epiteliales humanas. *H. pylori* se une con la adhesina BabA a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis (Wirth 2006). Esta codificada por los genes *babA1* y *babA2*, aunque solo el gen *babA2* es funcionalmente activo. La síntesis de BabA puede ser regulada para adaptarse a las condiciones medioambientales.

Se ha comprobado cómo la unión de *H. pylori* al receptor gástrico de Lewis promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales. Además, la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de los factores de virulencia que dañan al tejido del hospedador, pudiendo llevar al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Olfat 2005).

- **SabA** (sialic acid binding adhesion): se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (Unemo 2005).

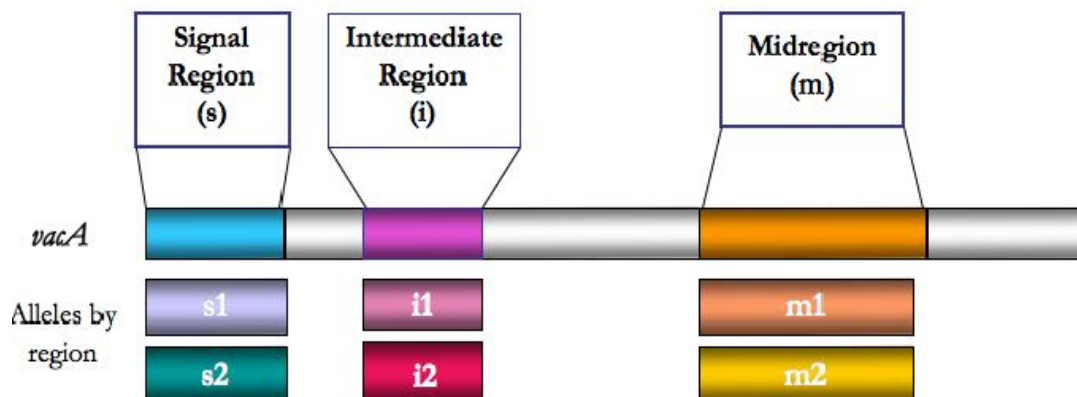
- **OipA** (outer membrane inflammatory protein): todas las cepas poseen el gen que codifica para esta adhesina, pero sólo algunas la expresan. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cual es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas *cagA* + (Yamoka 2008).

### 1.2.2 Factores de patogenicidad que contribuyen al daño de la mucosa gástrica.

- **VacA** (vacuolating cytotoxin): la proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular. En el citosol interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas. Es producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*. La infección por cepas que producen la toxina es más frecuente en pacientes con úlcera peptídica y cáncer gástrico que en pacientes que sólo padecen gastritis (Yamazadi 2005). Otros estudios no encuentran esta relación, y una posible

explicación es que el gen *vacA* tiene una estructura mosaico con varias formas posibles de presentación. Cuatro en la secuencia señal, que son *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2* y tres en la región media, *m1*, *m2a* y *m2b*. De la combinación de éstos podrían generarse distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos (Yang 1998, Rudi 1998). Así las cepas *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*. VacA se une a receptores tioproteínas tirosin-fosfatasa (RPTP) y la glicosidación postraslacional de los dominios RPTP pueden implicar diferentes respuestas celulares a las cepas *m1 vacA* o *m2 vacA*. Recientemente ha sido descrita una nueva región en el gen *vacA* que es la región intermedia, como se puede ver en la figura adjunta (Rhead 2007). Tiene varias posibles formas de presentación, *i1* e *i2*. Las cepas con la presentación *i1* son más citotóxicas y se encuentran más asociadas con la estructura alélica *s1m1*. Mientras que las cepas *i2* se encuentran más relacionadas con las cepas con la combinación alélica *s2m2* y que suelen presentar un mejor pronóstico.

Figura 1. Presentación esquemática del gen *vacA* de *Helicobacter pylori*.



*VacA* puede llevar a la muerte programada, de forma independiente a la vacuolización, pues induce la liberación de citocromo C de las mitocondrias a través de la activación de proteínas proapoptóticas Bax y Bak. También puede participar en el proceso de la apoptosis a través de la activación del receptor Fas/CD95, a través de diversas caspasas y de la ruptura de la membrana mitocondrial que, al afectar a la concentración de ATP celular, altera el ciclo celular.

La presencia de *vacA* puede inducir la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorgénicos. El VEGF está implicado en la neoangiogénesis vía el sistema TLR2/TLR9 y se encuentra sobreexpresado en distinto grado en carcinomas humanos dependiendo del tipo de cepa bacteriana, lo que podría explicar en parte el distinto potencial patogénico. Además, *VacA* amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxygenasa 2, en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar el desarrollo de procesos tumorgénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF, la activación de NF- $\kappa$ B y el aumento de citoquinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atróficas y metaplasia gastrointestinal (Rudnicka 2004). También está implicada en la alteración de las funciones mediadas por integrinas al interactuar con la fibronectina y la modulación de la respuesta inmunitaria de granulocitos, monocitos y células B y T, ya que inhibe la presentación de antígenos y la proliferación de células T. Por otro

lado interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (Atherton 1997).

- **CagA** (cytotoxin-associated gene A): la presencia del gen *cagA* se asocia más con síntomas graves, como la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (Chromvarin 2008). De hecho las cepas procedentes de pacientes con úlcera, son *cagA* positivas en un porcentaje mayor que las cepas procedentes de pacientes con gastritis (Erzin 2006, Chiarini 2009). Pero, igual que ocurre con el resto de factores de virulencia, en muchas ocasiones no hay asociación entre el genotipo de *cagA* y el estado clínico. Forma parte de la isla de patogenicidad Cag (*cagPAI*). Las islas de patogenicidad son segmentos de DNA que contienen mas de un gen de virulencia con la peculiaridad de que una simple delección lleva a la pérdida de al menos dos genes de virulencia con segmentos de DNA de más de 30 Kb. Tienen un papel fundamental en la contribución a la virulencia de las bacterias patógenas que los contienen y en el desarrollo de la enfermedad. En el caso de la isla de patogenicidad de *H. pylori* (*CagPAI*), tiene un tamaño de 37 a 40 kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas (*direct repeats*) de 31 pb. Su contenido G + C es del 35% en contraste con el 39% del cuerpo del genoma. Como muchos genes de virulencia los genes de la *cagPAI* no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales. Están reguladas por complejos mecanismos que pueden activarse o no dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmoralidad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, presencia o no de ácidos grasos volátiles de cadena corta, etc (Blaser 1995).

La *cagPAI* *H. pylori* codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta *CagA* y peptidoglicanos en las células epiteliales del hospedador. La translocación de *cagA* depende de la presencia de un canal de urea protón dependiente *UreI*. Ante un descenso de pH, *cagA* se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma. La proteína inyectada interactúa con un número elevado de moléculas de la célula hospedadora.

La diana molecular de *CagA* más estudiada es una fosfatasa SHP-2 (proteína tyrosine phosphatase). En el gen que codifica esta proteína se han encontrado mutaciones y polimorfismos que están relacionadas con la carcinogénesis gástrica. La propia activación de SHP-2 por *CagA* puede contribuir a la proliferación celular excesiva. Además, los cambios que se producen en la expresión génica en las células epiteliales tras la infección por *H. pylori* suelen ser dependientes de este sistema de secreción codificado por la *cagPAI*.

*CagA* puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxilo-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas *cagA*<sup>+</sup> debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación. La secuencia aminoacídica que se repite es GLU-PRO-ILE-TYR-ALA denominada “EPIYA motif”. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos que flanquea esta secuencia de GLU-PRO-ILE-TYR-ALA, los EPIYA reciben diferente nomenclatura: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. Hay estudios en los que se encuentra que la proteína *CagA* que contiene EPIYA-A y EPIYA-B, seguidas por

repeticiones de EPIYA-C es más frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes occidentales, mientras que el EPIYA-D lo es en cepas aisladas en pacientes asiáticos (Panayotopoulou 2006).

Hay una correlación entre la integridad de *cagPAI* y la gravedad de la enfermedad, ya que mutaciones puntuales llevan a la pérdida del sistema de secreción tipo IV por lo que no se puede translocar la proteína CagA. La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la *cagPAI* están asociados con un aumento de la producción de otras citoquinas como la IL-1b, TNF- $\alpha$  y del factor nuclear de transcripción NF $\kappa$ B. Varios estudios han revelado que el *cagPAI* puede presentarse como una única unidad no interrumpida, separándose en dos regiones por una secuencia o un fragmento cromosómico o bien presentarse parcialmente deleccionado. También se ha visto que la variabilidad de los EPIYA motifs juega un papel importante en la patogénesis producida por *H. pylori*. Las cepas *cagA* positivas y con número elevado de EPIYA motifs han sido relacionadas con un aumento de gastritis crónica y atrofia (Doyle 2001).

La detección del estado *cagA* se puede realizar de forma directa mediante la realización de una PCR al DNA de la cepa a estudiar o de forma indirecta, mediante serología. Mediante la PCR se puede detectar el gen *cagA*, que es un marcador de la isla de patogenicidad (Cerezo 2006). La mayoría de estudios moleculares han determinado el estatus *cagA* mediante la presencia o ausencia con *primers* específicos o sondas para este gen. Así pues, en realidad, la identificación de cepas *cagA*

negativas se ha realizado de forma indirecta (la ausencia de amplificación) (Sicinschi 2003).

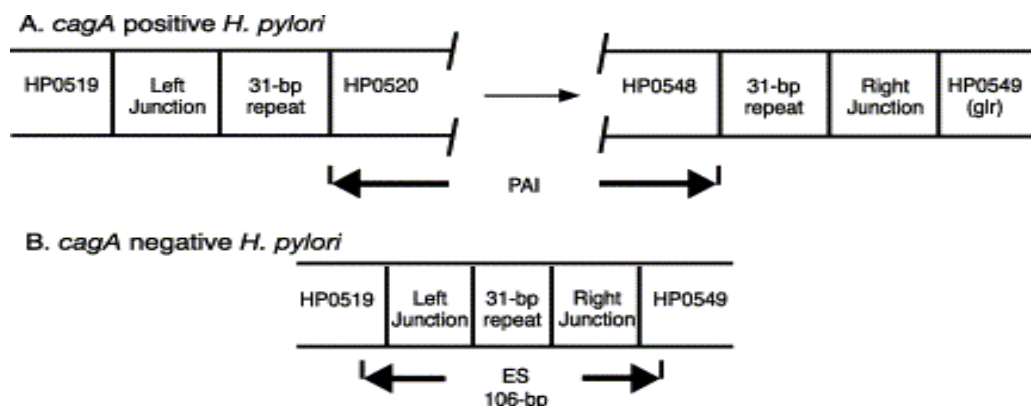
Esto tiene el riesgo de que se produzcan falsos negativos. Además las cepas *cagA* negativas no se detectarían en caso de que existan infecciones mixtas.

Por esto se han desarrollado detecciones directas para identificar las cepas de *Helicobacter pylori* que poseen la *cagPAI*. En las cepas *cagA* positivas, la *cagPAI* está flanqueada por dos secuencias de 31 bp. Sin embargo en las cepas *cagA* negativas esta misma secuencia sólo se encuentra presente en una copia. Usando *primers* de los sitios de inserción que flanquean la *cagPAI* se amplificará un fragmento de las cepas que no poseen la isla de patogenicidad.

**Figura 2:**

**A.** La figura muestra la isla de patogenicidad (PAI) en las cepas *cagA* positivas. La isla de patogenicidad está flanqueada por dos unidades repetidas de 31 pares de bases, y solamente se presenta una de estas unidades repetidas en las cepas *cagA* negativas.

**B.** Se muestra la región “empty-site” en todas las cepas *cagA* negativas (Sicinschi 2003).





Mediante métodos serológicos se intentan detectar en el suero del paciente los anticuerpos específicos anti-CagA, puesto que la proteína CagA es altamente inmunogénica. Se ha observado que más del 95 % de los pacientes infectados con cepas *cagA* positivas desarrollan respuesta inmunológica detectable frente a *cagA*. Los estudios se llevan a cabo mediante la realización de un ELISA o Western Blot (López-Brea 1998). Pero es un método que actualmente presenta resultados con muchas discrepancias. Éstas se han intentado explicar por distintos motivos: posibilidad de infecciones mixtas; falsos positivos; que la proteína CagA no se expone lo suficiente al sistema inmune del paciente porque la cepa que le infecta desarrolla un sistema secretor defectuoso; variabilidad de la proteína CagA o que la respuesta inmunológica no se produzca de forma detectable por estar obstaculizada por factores del hospedador.

### 1.2.3 Otros factores:

**-LPS (lipopolisacárido):** el LPS de *H. pylori* como el de otras especies bacterianas, presenta una estructura de tres dominios principales: la capa polisacárida externa o cadena específica O, el núcleo oligosacárido y el lípido A. La estructura química del LPS de *H. pylori*, en concreto la cadena específica O, puede mimetizar los antígenos de grupo sanguíneo de Lewis. Cuando esto sucede, se dice que son cepas que expresan los antígenos de Lewis. La expresión está asociada a patologías más severas. Algunos estudios muestran que cepas de *H. pylori cagA+* los expresan más frecuentemente.

El LPS de *H. pylori* es bastante inerte comparado con el de otras bacterias gram-negativas, y puede explicar la capacidad que tiene el microorganismo para evitar provocar una respuesta inmunológica eficaz del huésped. No estimula la producción de IL-8 en cultivos celulares epiteliales sino sólo y ligeramente en monocitos. Al inducir una baja respuesta inmunológica, la infección por *H. pylori* puede persistir durante más tiempo que aquéllas causadas por bacterias más agresivas, produciendo una infección crónica. Un caso similar se observa con *Bacteroides fragilis* que produce un LPS con una estructura parecida al de *H. pylori* y también baja inmunogenicidad. El LPS de *H. pylori* puede afectar a la integridad de la mucosa mediante la modulación de la actividad del pepsinógeno I en el estómago. La pepsina, enzima proteolítica, posee una alta capacidad mucolítica y puede ayudar a inducir ulceración duodenal. Se ha comprobado que los niveles de pepsinógeno gástrico se correlacionan con los niveles de pepsinógeno I sérico (componente endocrino del pepsinógeno secretado por las células principales). Además los niveles de pepsinógeno I caen tras la erradicación de *H. pylori* (Salaun 2006).

- **Tip  $\alpha$**  (TNF- $\alpha$  inducing protein): Las proteínas Tip $\alpha$  tienen una potente actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF- $\alpha$  y la activación de NF- $\kappa$ B.

Promueven la inflamación del cáncer (Suganuma 2006).

### 1.3 CLÍNICA DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR *H. pylori*.

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años o décadas desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico (Marshall 1984, Figueiredo 2005). Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad (Doorn 1997). Parece que algunos factores genéticos, ambientales o los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad (Höcker 2003).

#### 1.3.1 Manifestaciones digestivas.

- **GASTRITIS:** la gastritis que se origina después de la infección por *H. pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas y vómitos). La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad. La gastritis crónica por *H. pylori* es un proceso dinámico que evoluciona hacia la atrofia que afecta al antro y se extiende en dirección al cuerpo (Suerbaum 2002).

La colonización permanente de la mucosa gastroduodenal por *H. pylori* va a causar una inflamación con un infiltrado mixto en el que predominan los leucocitos polimorfonucleares, pero también con linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a

lo que se denomina gastritis crónica activa, como ya hemos dicho. Una de las características de este infiltrado en la edad pediátrica es la mayor presencia de linfocitos y células plasmáticas y una afectación más leve que la que tiene lugar en el adulto, por lo que se denomina gastritis crónica superficial activa. La bacteria puede ser identificada en biopsias gástricas mediante tinción de Giemsa y en presencia de mucha cantidad de bacterias incluso con hematoxilina-eosina. Después de la erradicación del microorganismo, la gastritis histológica mejora lentamente pero no desaparece totalmente hasta seis meses o un año después de la finalización del tratamiento.

La sintomatología asociada a la gastritis por *H. pylori* es muy variable. Puede expresarse con un cuadro compatible con lo que se llama dispepsia no ulcerosa, que se interpreta con síntomas como dolor en epigastrio o hemiabdomen superior, sensación de plenitud, náuseas y vómitos (Di Lorenzo 2005).

- **ÚLCERA PÉPTICA:** la asociación de *H. pylori* con la úlcera duodenal es clara, ya que un 90 - 95% de los pacientes presentan el microorganismo y se curan en su gran mayoría al erradicar la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica, también existe una clara relación, aunque sólo un 70% de este tipo de úlceras está asociada a la presencia de *H. pylori*, el resto se asocian al consumo de antiinflamatorios no esteroideos. La úlcera gástrica o duodenal relacionada con la infección por *H. pylori* es muy poco frecuente en la edad pediátrica respecto a lo que ocurre en el adulto.

Los pacientes con *ulcus* pueden expresar unos síntomas compatibles con lo que se llama dispepsia ulcerosa típica de la enfermedad ulcerosa péptica: epigastralgia o

dolor en hemiabdomen superior, que disminuye con la ingesta de alimentos y antiácidos. Es un dolor discontinuo que alterna con periodos de disminución de molestias, y que aumenta antes de las comidas. La sintomatología ulcerosa puede acompañarse de vómitos, anorexia, adelgazamiento y aunque con menos frecuencia la úlcera puede dar lugar a hemorragia digestiva.

- **CÁNCER GÁSTRICO:** la infección por *H. pylori* origina una gastritis superficial y si se cronifica puede aparecer atrofia, que es una condición precancerosa. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud incluyó a *H. pylori* como agente biológico carcinogénico para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncer gástrico (Trajkow 2007).

- **LINFOMA GÁSTRICO TIPO MALT:** el 90% de los pacientes con linfoma MALT son positivos para *H. pylori*. Este tipo de linfoma se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. Además, varios estudios apoyan la asociación de *H. pylori* con esta enfermedad puesto que tras la erradicación de la bacteria se ha observado la regresión del linfoma de bajo grado (Toshiro 2004).

### 1.3.2 Manifestaciones extradigestivas.

Muchas publicaciones han relacionado la infección por *H. pylori* con una variedad de manifestaciones clínicas extradigestivas (síndrome de muerte súbita del lactante, enfermedad coronaria, colangitis esclerosante primaria...) sin que se haya podido demostrar la causa (Prelipcean 2007). Sin embargo si se han demostrado diferentes grados de evidencia que sustentan la relación de la infección por *H. pylori*, como:

- anemia ferropénica refractaria: diversos trabajos han demostrado una asociación entre la infección por *H. pylori* y la anemia ferropénica refractaria, en especial en pacientes pediátricos por poseer unos depósitos de hierro bajos (Marignani 1997, Yakota 2008). No está claro si se trata de un incremento en las pérdidas de hierro o de una disminución de la absorción, pero lo que si es cierto es que la erradicación del germen permite la normalización de las cifras de sideremia y de los valores de ferritina en determinados pacientes con anemia ferropénica refractaria portadores de una gastritis por *H. pylori*.

Hay diferentes hipótesis para explicar la asociación de *H. pylori* con la anemia. La anemia podría estar en relación con pérdidas microscópicas de sangre debidas a la gastritis crónica superficial activa o a una absorción duodenal de hierro disminuida que podría explicar el menor aporte de hierro y por tanto, una mayor demanda del mismo. La hipo acidez secundaria a la gastritis y el bajo nivel de ácido ascórbico en el estómago de estos niños sería la causa de la disminución de la absorción. Otra posible explicación podría ser el incremento del secuestro del hierro por la lactoferrina (proteína ligadora de hierro) cuyos niveles en la mucosa gástrica de los

pacientes infectados por *H. pylori* están elevados. Dado que *H. pylori* posee múltiples sistemas de adquisición de hierro, que le permite tomarlo del hierro disponible en el microambiente de la luz gástrica, otra de las teorías de la ferropenia es la propia competencia por el hierro entre la bacteria y el huésped infectado.

- Púrpura trombocitopénica idiopática: recientemente se ha observado que algunos pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica han respondido a la erradicación de *H. pylori* con un incremento del número de plaquetas (Emilia 2007). La explicación biológica de esta posible asociación es la similitud de los anticuerpos plaquetarios del suero con la citosina asociada al gen *cagA* del *H. pylori*.

- Retraso en el crecimiento: en la segunda mitad de la década de los 90 se publicaron varios trabajos en los que se encontraron una relación significativa entre la infección y el retraso de la talla de niños y adolescentes, postulándose que la infección podría afectar al crecimiento (Cohem 1991). Estudios posteriores prospectivos, bien diseñados, no han encontrado ninguna evidencia del papel de *H. pylori* en relación con la talla y sí con el status socioeconómico. Teniendo en cuenta que la prevalencia de la enfermedad es mayor en niños de los países en vías de desarrollo sometidos a un mayor riesgo de episodios diarreicos e hiponutrición, la causa del retraso estructural de estos niños infectados está más en relación con los frecuentes episodios diarreicos y el déficit nutricional que con la colonización por *H. pylori* (Bruce 2008).

Otra de las posibles explicaciones podría ser la afectación de la hormona del crecimiento en los niños infectados. Es decir el efecto de la gastritis sobre las

hormonas que controlan el crecimiento. Recientemente se ha demostrado que el estómago es una fuente de grelina y leptina, la colonización por *H. pylori* y la gastritis produciría un aumento de los niveles de leptina y una disminución de los niveles de grelina, lo que repercutiría en el apetito, disminuyendo el aporte calórico y afectando secundariamente a su índice de masa corporal (Osawa 2008, Weigt 2009).

-Otras manifestaciones extradigestivas: se ha asociado la infección por *H. pylori* con la aparición de urticarias, al encontrarse títulos elevados de anticuerpos específicos tipo IgG frente a *H. pylori* en algunos casos de pacientes con urticaria crónica (Cuevas 2006), pero también en otras situaciones como el asma o la enfermedad inflamatoria intestinal.

#### **1.4 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*.**

Aunque se estima que la infección por esta bacteria afecta aproximadamente al 50% de la población mundial. Sólo entre un 10% y un 15% de los individuos infectados sufrirán *ulcus* peptídico y hasta un 1-3% desarrollarán cáncer gástrico. Estas cifras revelan la importancia de esta infección y justifican el interés despertado por el conocimiento de su epidemiología, factores ambientales de riesgo y forma de transmisión.

Aunque no se conoce el modo definitivo de transmisión de la infección, se ha postulado que ésta puede ocurrir por la vía gastro-oral, oral-oral y fecal-oral (Mladenova 2006). *H. pylori* se encuentra con frecuencia en el vómito de las personas infectadas. La



saliva y las heces también pueden contener bacilos. Algunos autores apuntan a que la transmisión persona a persona, especialmente en el núcleo familiar, constituye el principal mecanismo de propagación de la bacteria (Kivi 2006). Por otra parte pueden existir diferencias entre países desarrollados y en vías de desarrollo (Poddar 2007). En los primeros el mecanismo de contagio más frecuente podría ser por contacto interpersonal directo vía oral-oral, mientras que en los segundos predominaría la ruta oral-fecal. La falta de infraestructuras sanitarias, el hacinamiento, los bajos estándares socioeconómicos y educativos se asocian con tasas más elevadas de prevalencia y de reinfecciones (Ahuja 2002).

Existen dos patrones de seroprevalencia frente a *H. pylori*: el primero de ellos incluye aquellas poblaciones con una elevada tasa de infección durante la infancia y el segundo se caracteriza por un bajo nivel de seroprevalencia en la niñez junto con un incremento gradual en función de la edad. Estos patrones parecen reflejar una correlación inversa entre la situación socioeconómica y el riesgo de infección. El primer patrón es típico de regiones del tercer mundo, mientras que el segundo corresponde a naciones industrializadas (Bruce 2008).

En nuestro medio, la prevalencia en individuos sanos es alta, se sitúa en torno al 60 % (Sánchez Ceballos 2006). En un estudio realizado en 2006 en una muestra de la población general residente en la Comunidad de Madrid, con edades comprendidas entre los 4 y 82 años, se comprobó que los porcentajes de seroprevalencia se elevaron con la

edad, de forma que las personas mayores de 60 años registraron un incremento de prevalencia de *H. pylori*.

Ciertos factores dependientes tanto del microorganismo como del huésped pueden influir en la evolución de esta infección hacia un estado crónico asintomático o hacia el desarrollo de manifestaciones clínicas. Por este motivo, los datos obtenidos a partir de los trabajos de seroprevalencia, aunque sirven para clarificar la extensión de la infección, deben interpretarse con cautela. En ocasiones se dan aparentes contradicciones entre los niveles de prevalencia y la incidencia real de la enfermedad. Éste es el caso de los denominados “enigmas” africano y asiático.

En África, pese a los elevados niveles de la infección en individuos de todas las edades, las tasas de cáncer gástrico permanecen muy bajas. Para explicar esta cuestión se han postulados factores relacionados con la virulencia variable de diferentes cepas, el polimorfismo genético humano y el tipo de dieta (Graham 2009).

En Asia la infección es más frecuente y se contrae más tempranamente en países poco desarrollados como la India, Bangladesh, Pakistán o Tailandia (con niveles de seroprevalencia en adultos entre el 55 y el 92%). Sin embargo otras naciones como China o Japón, con cifras inferiores de serología en adultos, presenta mayores tasas de cáncer gástrico. Una posible justificación para estos hechos vendría dada por diferencias en la virulencia de las cepas. Mientras que en Japón casi la totalidad de los pacientes infectados lo están por cepas *cagA* positivas, en naciones occidentales una considerable

proporción de casos están originados por cepas *cagA* negativas. Los pacientes que sufren cuadros menos graves (gastritis, úlcera duodenal o gástrica) como los que presentan cuadros malignos pueden albergar cepas *cagA* positivas. Sin embargo esto también ha sido cuestionado. En Asia se ha documentado la existencia de dos subtipos de cepas *cagA* positivas denominado variante asiática Este y variante asiática Oeste. La variante *cagA* positiva asiática Este (circula mayoritariamente de forma endémica en países con mayores tasas de cáncer gástrico) se asocia con mayores grados de inflamación y atrofia de la mucosa gástrica y por tanto con el desarrollo de formas clínicas de peor pronóstico.

## **1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA LA DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*.**

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos (que requieren la realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica) o no invasivos (métodos para los que no se requiere realización de endoscopia). Un método diagnóstico ideal sería uno no invasivo o mínimamente invasivo, no caro, seguro, disponible en todos los centros y que sea capaz de diferenciar infección activa de pasada. Ninguno de los métodos que existen en la actualidad cumple todas estas características. Todos los métodos presentan ventajas e inconvenientes. A la hora de elegir uno hay que tener en cuenta el fin (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro sanitario dónde se realice el diagnóstico y las características del paciente (López-Brea 2004, Steven 2005).

### 1.5.1 Métodos invasivos.

La endoscopia con toma de biopsia para el estudio histológico permitirá no sólo diagnosticar la infección mediante el cultivo de dicha biopsia, sino que también el cultivo es imprescindible para poder conocer la sensibilidad a los antimicrobianos, con el fin de aplicar el tratamiento más efectivo en cada paciente y para conocer los porcentajes de sensibilidad en cada población.

- **CULTIVO:** durante el transporte la biopsia debe protegerse de la deshidratación y mantenerse a baja temperatura. Se recomienda guardar las muestras a 4° C si se van a procesar dentro de las primeras 4 horas o congelar a -70° C en caso de que se demore más tiempo. Los medios de transporte más utilizados son: solución de glucosa al 20 % y suero fisiológico. Algún estudio indica que mejor que el transporte en medio salino es sembrar directamente la biopsia en agar chocolate o en el sistema de transporte Portagerm *pylori*. El cultivo es considerado el método de referencia (patrón oro) para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. La principal ventaja que posee este método es que puede estudiar la sensibilidad de las cepas a los distintos agentes antimicrobianos. El hecho de tener la cepa nos permitirá la realización de distintos estudios como puede ser el conocer los factores de virulencia o el poder tipar las cepas. Como desventaja cabe destacar que es un método lento de diagnóstico que puede demorarse varios días y que la sensibilidad de la técnica depende de la experiencia en su cultivo y de que la toma y el transporte se realicen en las condiciones adecuadas. La identificación se realiza mediante visión en fresco con un microscopio de contraste de fases para

ver la morfología o bien mediante tinción de Gram. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación. La muestra más habitual para el cultivo es una biopsia a partir de mucosa gástrica.

- **HISTOLOGÍA:** el estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*. La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además permite detectar zonas de metaplasia intestinal. La técnica de tinción es fácil, rápida, de bajo coste y de alta utilidad. Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Giemsa, Carbolfuchina, Genta o tinciones inmunohistoquímicas. La visión microscópica tiene una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo.
  
- **UREASA:** la prueba de la ureasa permite detectar la presencia de la descomposición de la urea en anhídrido carbónico y amoníaco, que se demuestra mediante un cambio de color en el medio que contiene un indicador de pH. La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica. Existen diferentes reactivos comerciales que contienen urea a diferentes concentraciones y un indicador de pH. Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%. La seguridad diagnóstica de la prueba dependerá de la localización de la biopsia utilizada, de la carga bacteriana y del tratamiento previo con antibióticos o con inhibidores de la bomba de protones.

- **PCR:** una de las ventajas que tiene es que no requiere condiciones de transporte tan estrictas. Permite utilizar el DNA para distintos estudios aparte del diagnóstico de la infección. Algunos estudios la encuentran igual de sensible que el cultivo a partir de biopsia gástrica. Actualmente se está utilizando la PCR a tiempo real que además permite la detección de cepas resistentes a antibióticos. En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del DNA de *H. pylori* directamente de la biopsia gástrica pero también de otras muestras como heces, saliva o agua (Simala-Grant 2004). La mayoría de las técnicas se basan en la PCR, tanto clásica como a tiempo real. El objetivo ha sido el siguiente:

- **detección de genes específicos de la bacteria:** se han utilizado diversos protocolos como el estudio del gen de la ureasa, el gen de la glutamato racemasa (*glmA*) o el gen 16S RNAr, entre otros (Woo 2009).

- **detección de factores de virulencia:** se pueden detectar la presencia de diferentes factores de virulencia, como los tipos del gen *vacA* (Chisholm 2002, Yamazaki 2005).

- **detección de mecanismos de resistencia:** la PCR, tanto clásica como en tiempo real, se ha utilizado con éxito para detectar la resistencia a claritromicina, puesto que son capaces de detectar mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr, que confieren resistencia a este antimicrobiano. También se ha aplicado la PCR en tiempo real para detectar la resistencia a tetraciclina debida a mutaciones en el 16S DNAr en biopsias gástricas (Stone 1997, Doorn 2001, Owen 2002, Alarcón 2003).

- **como métodos de tipado:** para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares (Achtman 1999).
  
- **HIBRIDACIÓN *IN SITU*:** la infección puede ser diagnosticada mediante sondas de hibridación fluorescentes (FISH: fluorescent *in situ* hybridization) utilizadas en biopsia gástrica (*in situ*) que se unen al 16S RNAr de *H. pylori*. También se puede detectar la resistencia a claritromicina si estas sondas se unen al 23S RNAr. Esta técnica se puede realizar en aproximadamente tres horas (Caristo 2008).

### 1.5.2 Métodos no invasivos.

El método ideal para diagnosticar la infección sería uno no invasivo o mínimamente invasivo, capaz de diferenciar infección activa de infección pasada. Los métodos desarrollados hasta ahora pueden tener utilidad en determinadas circunstancias, como la evaluación del seguimiento del tratamiento o estudios epidemiológicos.

- **SEROLOGÍA:** los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero. La serología es útil en los estudios de poblaciones seleccionadas, sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo. *H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica. El sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un

aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección. Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico. La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA puede tener especial interés en estudios sobre virulencia. Puesto que la detección de anticuerpos depende del antígeno utilizado, considerando la heterogeneidad genética de *H. pylori*, algunos autores recomiendan el uso de mezclas de antígenos procedentes de varias cepas para mejorar la sensibilidad de estas técnicas así como su valoración en cada medio. Se han utilizado varias clases de antígenos, que van desde antígenos parcial o altamente purificados (ureasa, etc.). La técnica más utilizada es EIA cuantitativo, que permite, además del diagnóstico primario, la monitorización del tratamiento. Los métodos basados en la técnica del Western Blot se utilizan para el estudio de la respuesta frente a antígenos concretos, como CagA y VacA (López-Brea 1998).

- **TEST DE SANGRE COMPLETA:** es un inmunoensayo indirecto realizado en fase sólida. Existen tiras comercializadas de fácil uso (Pyoriset®, AccuStat®...) Se detectan anticuerpos IgG frente a *Helicobacter pylori* presentes en la sangre. En la misma consulta se puede obtener una gota de sangre del paciente. Se ha visto que al aumentar el tiempo de lectura 10 minutos a 6 horas aumenta la sensibilidad de la prueba. Este test no se recomienda actualmente.



- **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN ORINA:** es una inmunocromatografía en fase sólida que también detecta IgG frente a *H. pylori*. Diversos estudios informan de una buena sensibilidad y especificidad. Aunque habría que tener cuidado con aquéllas orinas con sedimentos anormales. Este test, al igual que el anterior, tampoco está recomendado.
  
- **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS EN SALIVA:** aunque debido a la comodidad de la obtención de la muestra se ha esperado mucho de esta técnica, los datos de sensibilidad obtenidos, que rondan el 80 %, no permiten ser optimistas respecto a su implantación.
  
- **PRUEBA DEL ALIENTO (Urea Breath Test: UBT):** es el método indirecto para detectar la ureasa de *H. pylori*. Si *H. pylori* se encuentra en el estómago va a hidrolizar la urea ingerida previamente y se va a liberar CO<sub>2</sub> marcado que se absorbe, difunde a sangre, es transportado a los pulmones y es liberado con el aliento. Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *H. pylori*. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria, ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado.
  
- **ANTÍGENO EN HECES:** es un método directo no invasivo que permite la detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces. Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con

anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden existir pequeñas diferencias entre ellos, habiéndose obtenido mejores resultados con los anticuerpos monoclonales. Se ha descrito como válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección. Se trata de un ensayo cualitativo. La técnica aporta una información muy valiosa por la fácil obtención y la conservación de la muestras, se puede realizar en cualquier laboratorio de microbiología y no necesita la colaboración del paciente. Es muy útil para niños pequeños (Andrews 2001, Falsafi 2005, Raguza 2005, Shaikh 2005).

## **1.6 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*.**

En los últimos años se han realizado diferentes reuniones de consenso sobre la infección por *H. pylori*. Entre ellas destacan la del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. por ser el primero que recomendó el tratamiento erradicador en pacientes infectados por *H. pylori* y úlcera duodenal, pero también las que se realizaron en Canadá en 1997 y 1999, el Consenso Asiático (Asia Pacific Consensus Conference, 1999), el Consenso Latino-americano (2000), el Consenso Europeo (Europeo: Maastrich Consensus, 1997 y 2005) y el Consenso Español (1999).

El Consenso de Maastrich del año 2005 considera que existe una indicación clara de tratamiento en caso de:

- enfermedad ulcerosa péptica: duodenal activa o cicatrizada, gástrica o complicada.
- linfoma MALT de bajo grado.
- gastritis atrófica.
- resección después de cáncer gástrico.

El consenso Español realizado en 1999 recomienda también tratamiento en la duodenitis erosiva y el de Maastrich considera una indicación clara para diagnosticar y tratar:

- los familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico.
- por deseo del paciente.
- sería una posible indicación: dispepsia funcional, enfermedad por reflujo gastroesofágico o los pacientes que toman AINEs.

### **1.6.1 Pautas de tratamiento.**

Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 ó 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso, que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 10 días, aunque algunos autores han probado pautas cortas, de 3 a 5 días que incluyen 3 antibióticos y otros recomiendan pautas largas, de más de 10 días. Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica (Oderda 2007). Se recomienda la pauta de tratamiento triple

con un inhibidor de la bomba de protones y dos antimicrobianos como primera opción. Si este tratamiento falla, se debe evitar repetir dos veces el mismo tratamiento y se recomienda realizar estudios microbiológicos (Alarcón 2000, Mégraud 2004).

El consenso de Maastricht III recomienda una bomba inhibidora de protones o ranitidina con dos antibióticos de los siguientes: claritromicina, metronidazol o amoxicilina (Malfertheiner 2007).

#### **1.6.2 Antiácidos utilizados para erradicar *H. pylori*.**

**COMPUESTOS DE BISMUTO:** citrato de bismuto coloidal y salicilato de bismuto. Actúan como citoprotectores. Aumentan la producción de moco y prostaglandinas por la mucosa gástrica. Además, evitan la unión de *H. pylori* a la superficie de la mucosa gástrica y destruyen la integridad de la pared bacteriana. Pero se desconoce con certeza el mecanismo de acción de estos compuestos (McColl 1998)..

**FÁRMACOS ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE HISTAMINA:** cimetidina, famotidina, nizatidina, roxatidina, ebrotidina, ranitidina y ranitidina citrato de bismuto. Actúan en la membrana basolateral de la célula parietal gástrica como antagonistas competitivos de la histidina sobre los receptores de histamina. Reducen por tanto la secreción ácida tanto basal como la estimulada por gastrina, histidina y agonistas muscarínicos.

**INHIBIDORES DE LA BOMBA DE PROTONES:** omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, esomeprazol y rabeprazol. Actúan en la célula parietal (membrana subapical). Inhiben de forma reversible la enzima H-K ATPasa, bloqueando toda secreción de ácido (Lins 1999, Laine 2000).

### 1.6.3 Antimicrobianos utilizados para erradicar *H. pylori*.

*H. pylori* es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* pero no todos presentan eficacia *in vivo*. Los antimicrobianos que muestran eficacia clínica y que se utilizan o se pueden utilizar en los tratamientos para erradicar la infección son los siguientes:

**AMOXICILINA:** entre todos los betalactámicos ensayados *in vitro* sólo amoxicilina ha demostrado ser útil en el tratamiento de la infección por *H. pylori* y se utiliza en diferentes pautas de tratamiento asociado a metronidazol, tetraciclina o claritromicina. Es el betalactámico más estable en el medio ácido y el que alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral. Los antibióticos betalactámicos actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana de los microorganismos. Se han descrito alteraciones de las PBPs, concretamente en el gen *pbp-1* A que se asocian con resistencia a este antimicrobiano. Además de las alteraciones en las PBPs, se ha sugerido que la reducción de la permeabilidad o la expulsión activa pueden contribuir a producir niveles más altos de resistencia (Rimbara 2007). En Europa, la resistencia a amoxicilina es muy baja, menor del 1%,

han aparecido algunas cepas resistentes en Italia, Grecia, Dinamarca e Inglaterra. Pero en otros países, como en un estudio realizado en Irán, la resistencia a amoxicilina fue del 56% (Raffeeey 2007).

**CLARITROMICINA:** es el macrólido más utilizado, que presenta una excelente actividad *in vitro* frente a *H. pylori* y tiene modificaciones químicas con respecto a los macrólidos más antiguos, que le confieren mayor estabilidad en medio ácido (Goldman 1994). Los macrólidos inhiben la síntesis de proteínas mediante su acción a nivel de los ribosomas bacterianos (Schlünzen 2001). Inhiben la síntesis proteica mediante su unión reversible a la subunidad 50 S del ribosoma, lo cual provoca un bloqueo en la transpeptidación, un bloqueo en la translocación y así se impide la elongación de la cadena peptídica. Emplea el mismo punto de unión que la lincomicina y el cloranfenicol (Pfister 2005). El mecanismo de resistencia a macrólidos observado en *H. pylori* y otras bacterias, como *Mycoplasma pneumoniae* y micobacterias atípicas, es debido a una mutación en la secuencia de la región peptidiltransferasa del RNA ribosómico 23S en la subunidad 50S (Verlasovic 1997, Tait-Kamradt 2000, Garrido 2007). Las mutaciones más frecuentemente encontradas se producen en las posiciones 2058 y 2059 de *E. coli* que coinciden en *H. pylori* con 2142 y 2143, respectivamente. La mutación más frecuente en aislamientos clínicos es la A2143G (prevalencia 53% a 95% según los estudios), seguida de la mutación A2142G y en menor proporción la mutación A2142C. Otra mutación que produce resistencia a claritromicina y que ha sido descrita es en la posición T2182C (Khan 2004, Burucoa 2005). También se han descrito otras mutaciones, T2717C y A2515G,

G2224A, C2245T, T2289C y C2611A que se asocian con resistencia a claritromicina (Kim 2002, Hao 2004, Fontana 2002, Rimbara 2008, Kim 2008, Francesco 2009). En los últimos años se ha observado un incremento de resistencia a claritromicina en países europeos como: Francia, Portugal, Turquía o España, entre otros. En contraste, en los países nórdicos no se ha observado este incremento. Esta diferencia se debe principalmente al consumo de los macrólidos. Claritromicina fue comercializada en España a principio de los años 90, y ha sido muy utilizado para tratar enfermedades del tracto respiratorio superior.

**METRONIDAZOL:** es un antimicrobiano ampliamente utilizado en el tratamiento de la infección por *H. pylori* por conseguirse, junto con amoxicilina y sales de bismuto, tasas muy altas de erradicación (López-Brea 1999). Metronidazol y otros antibióticos nitroimidazólicos son activos después de la reducción del grupo nitro unido al anillo imidazólico. Este proceso genera compuestos intermediarios de vida corta y altamente tóxicos. El metronidazol tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva es químicamente reducido por proteínas del metabolismo anaerobio (proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox). Estas proteínas son exclusivas de algunos parásitos y de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas. El metronidazol reducido produce pérdida de la estructura helicoidal del DNA, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. En *H. pylori* se ha descrito una piruvato flavodoxina oxidoreductasa, que puede ser la proteína capaz de reducir el metronidazol y otros posibles aceptores de electrones, como ferredoxina, flavodoxina, proteína ferredoxina-like o NAD(P)H flavin nitrorreductasa.

El mecanismo de resistencia a metronidazol es menos conocido pero parece ser que el principal mecanismo es la inactivación del gen *rdx*, que codifica para una nitrorreductasa insensible al oxígeno (Jenks 1999). La inactivación se puede producir por una mutación puntual que crea un codón de terminación adicional, dando lugar a una proteína truncada o por la inserción de una secuencia IS605. Otros genes, como *frxA*, *fdxB*, *ribF* o *mdaB*, pueden tener también implicación en la resistencia (Know 2001, Marias 2003, Yang 2004, Matteo 2006, Kim 2009). La resistencia a metronidazol está aumentando en los últimos años en España y en el resto del mundo. El porcentaje de resistencia es muy variable; en los países subdesarrollados es mayor, debido principalmente al alto consumo de este antibiótico para tratar enfermedades parasitarias e infecciones ginecológicas (Albert 2006, Parsons 2001).

**TETRACICLINA:** la tetraciclina presenta buena actividad *in vitro* y ha demostrado su utilidad en la práctica clínica, aunque su principal inconveniente es el no poder utilizarse en enfermos pediátricos. La tetraciclina atraviesa la membrana externa a través de porinas mediante difusión pasiva, llega al citoplasma por un mecanismo dependiente de energía y en el interior se unen reversiblemente a la subunidad 30 S produciendo una inhibición de la síntesis de proteínas. En cuanto a los mecanismos de resistencia de las tetraciclinas se puede producir por: cambios en la permeabilidad de la membrana, una expulsión activa a través de una proteína de membrana, protección del ribosoma mediante una proteína soluble e inactivación enzimática del propio antibiótico. El mecanismo de resistencia descrito para *H. pylori* consiste en mutaciones puntuales en el gen 16S RNA en la posición 926-928 (cambio



de AGA por TTC) (Lawson 2005). Cuando se lleva a cabo una única sustitución se produciría resistencia de bajo nivel; sin embargo, si se presentan 3 mutaciones la resistencia sería de alto nivel. También se ha propuesto como mecanismo de resistencia la reducción de la permeabilidad, ya que algunas cepas resistentes no presentan las mutaciones descritas y muestran una disminución de la acumulación de la tetraciclina. La resistencia a tetraciclinas de *H. pylori* es muy baja.

**FURAZOLIDONA:** los nitrofuranos tienen también buena actividad frente a *H. pylori*, siendo furazolidona el más eficaz en la curación de la úlcera duodenal y en erradicar *H. pylori* de la mucosa gástrica. El mecanismo de acción es similar al del metronidazol: reducción de la prodroga llevando a la formación de radicales nitro aniónicos y se produce daño del DNA. El mecanismo de resistencia no se conoce pero es diferente del de metronidazol porque la resistencia no es cruzada.

**LEVOFLOXACINO:** el rango inhibitorio de quinolonas como ciprofloxacino y ofloxacino frente a *H. pylori* es similar a betalactámicos y macrólidos. Sin embargo las primeras quinolonas utilizadas no mostraron eficacia clínica, por la disminución de la actividad en pH ácido o por el desarrollo de resistencia después del tratamiento. Actualmente levofloxacino se ha utilizado con éxito en la erradicación de la bacteria. Las quinolonas inhiben la replicación del DNA, actúan en el DNA cromosómico bacteriano, uniéndose a las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las quinolonas actúan sobre dos proteínas diana: DNA girasa y topoisomerasa IV (ambas son topoisomerasas responsables de los cambios en la

topología del DNA). En el caso de bacterias Gram negativas, como es el caso de *H. pylori*, actúan inhibiendo la DNA girasa, la cual es un tetrámero con dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*. La función principal de la DNA girasa es mantener un nivel de enrollamiento del DNA que facilite la formación de los complejos durante la replicación y la transcripción. En cuanto a los mecanismos de resistencia descritos principalmente son alteraciones en alguna de las subunidades de la DNA-girasa, mutaciones en el *gyrA*: el gen que codifica la subunidad A. Las mutaciones suelen producirse en una región concreta de esos genes que se denomina **QRDR** (quinolone resistance domain region). Cambios en los aminoácidos de esta región alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo girasa-DNA, y la resistencia se debe a una disminución de la afinidad de la quinolona por dicho complejo. Otro mecanismo de resistencia de las bacterias a las quinolonas puede ser por alteraciones de porinas, debido a la disminución en la acumulación de antibiótico, bien por descenso en la permeabilidad de la membrana externa o mediante un incremento de la expresión de un sistema de expulsión activa. En *H. pylori* se han descrito cuatro tipos de mutaciones en el gen *gyrA*, cambio de Asn por Lys en el aminoácido 87, cambio de Ala por Val en el aminoácido 88, cambio de Asp por Gly, Tyr o Asn en el aminoácido 91 y mutaciones simultáneamente en 91 (Asp-Asn) y en 88 (Ala-Val) (Fujimura 2004, Tankovic 2003). Otras mutaciones en el gen *gyrA* o en el gen *gyrB* pueden aparecer junto con las anteriores y no tienen el mismo impacto clínico. La resistencia a quinolonas, aunque se ha observado un aumento, todavía continúa siendo baja (Kim 2005).

**RIFABUTINA:** es un antibiótico derivado semi-sintético de la rifampicina, utilizado normalmente para el tratamiento de infecciones producidas por micobacterias y en infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* o *Legionella* spp. entre otras, ha demostrado tener una alta eficacia contra *H. pylori*. El mecanismo de acción consiste en la inhibición del inicio de la síntesis de RNA al inhibir la enzima RNA polimerasa (Cibrelus 2006). La resistencia a la rifampicina tiene lugar por mutaciones en el gen *rpoB*, que codifica la subunidad beta de la RNA polimerasa, que reducen la afinidad de esta subunidad por el antibiótico. Las mutaciones descritas corresponden a los aminoácidos 149, 524-545 y 586. La resistencia a este antibiótico es todavía baja (Glocker 2007).

#### **1.6.4 Causas de fracaso del tratamiento.**

En el fracaso del tratamiento pueden intervenir factores relacionados con el mismo tratamiento (dosis inadecuadas, una duración incorrecta del tratamiento y el tipo y la dosis del inhibidor de la bomba de protones), factores del paciente (falta de adherencia al tratamiento) o factores de las cepas (Graham 2008). Entre los factores del microorganismo es muy importante la resistencia a los antibióticos y quizá las características particulares de la cepa (Alarcón 1999).

### 1.6.5 Métodos de detección de resistencia.

La resistencia a antimicrobianos se puede detectar mediante diferentes métodos que se pueden clasificar en fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos están basados en la apariencia macroscópica tras cultivo de la bacteria y los métodos genotípicos en la detección de los genes y las mutaciones implicadas en la resistencia (Mégraud 2007).

**DILUCIÓN EN AGAR:** es el método fenotípico de referencia, pero poco útil para realizar de forma rutinaria, aunque válido para confirmar los resultados obtenidos por otros métodos y realizar estudios para conocer la tasa global de resistencia en un área determinada. El método de dilución en caldo es útil para otras bacterias pero no para *H. pylori* ya que se contamina con facilidad.

**DIFUSIÓN CON DISCO:** es el método fenotípico más fácil y barato para determinar la sensibilidad *in vitro*, pero los resultados que se obtienen no siempre se correlacionan con los obtenidos por el método de dilución en agar, aunque algunos autores sí observan buena correlación y lo recomiendan como práctico, seguro y con aplicación para predecir los resultados clínicos (McNulty 2002)

**MÉTODO DEL EPSILÓMETRO (E-TEST):** es un método cuantitativo para realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* basado en la difusión. El método del epsilómetro está especialmente recomendado en organismos fastidiosos y cuando se

deben probar pocos microorganismos o pocos antibióticos y tiene diferentes ventajas sobre los métodos tradicionales de dilución en agar o difusión en agar.

**MÉTODOS MOLECULARES:** la detección de las mutaciones que confieren resistencia a claritromicina en *H. pylori* se ha realizado mediante técnicas de microbiología molecular como reacción en cadena de la polimerasa. Versalovic y cols. desarrollaron en 1996 una PCR que amplificaba un fragmento de 1,4 Kpb de la región 23S del RNAr y posteriormente se detectaba la mutación en A2142G y A2143G tras digestión con los enzimas *MboII* y *BsaI*, respectivamente (Versalovic 1997). Se han desarrollado otros métodos que permiten detectar una o varias de las mutaciones relacionadas con la resistencia como: secuenciación, PCR “mismatched” que permite detectar la mutación A2142, PCR y posterior ensayo de unión con oligonucleótidos, hibridación en fase sólida o en fase líquida e hibridación *in situ* (Alarcón 2003). Recientemente se ha utilizado la PCR en tiempo real, que permite detectar cualquier tipo de mutación, según diseño de la sonda y tiene la ventaja que se puede realizar en 1 hora (Regnath 2004). La mayoría de los protocolos realizados mediante PCR en tiempo real se basan en la utilización de dos sondas entre las que se produce una transferencia de energía cuando se encuentran hibridadas en el DNA diana. Cuando se completa el proceso de amplificación se determina la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del DNA amplificado. Si existe una mutación puntual, la  $T_m$  del fragmento amplificado será unos grados más baja (al menos 4-5° menos) que cuando no existe (López-Brea 2006). Actualmente existen kits comerciales diseñados para detectar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a claritromicina. Tiene numerosas ventajas

frente a la PCR clásica; las principales son su rapidez, que evita las contaminaciones al trabajar siempre en tubos cerrados, que hace posible el uso de diferentes sondas en la misma reacción con diferentes marcadores, que permite trabajar con un gran número de muestras al mismo tiempo, que es altamente sensible y específica y que permite la cuantificación del producto amplificado.

## **1.7 VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS CEPAS.**

El tamaño del genoma de *Helicobacter pylori* oscila de unas cepas a otras de 1,60 a 1,70 mega bases (Mb), con un contenido de G+C entre el 35-40% (McClain 2009). Las cepas de *H. pylori* son genéticamente muy diversas, tal diversidad está asociada con un mayor o menor grado de inflamación de la mucosa gástrica (Yamaoka 2008). Su gran diversidad genética es probablemente consecuencia de múltiples factores, incluyendo el alto grado de mutación y un alto grado de recombinación genética intraespecies. La gran diferencia encontrada en las secuencias de DNA de *H. pylori* de diferentes zonas geográficas, es el resultado de la migración humana y la unión de las razas (Covacci 1999). La variación genética es detectable por el análisis de la secuencia de nucleótidos de genes individuales en diferentes cepas de *H. pylori*. Estudios de la secuencia del DNA pueden dar información de los orígenes geográficos de las cepas (Devi 2007). Hay un estudio llevado a cabo por Falush *et al* en el que se analizan la secuencia de DNA de 370 cepas de *H. pylori* aisladas de personas de diferentes partes del mundo, se identificaron siete poblaciones de cepas con distintos orígenes geográficos. Estas diferentes poblaciones reflejan las migraciones humanas desde África a otras partes del mundo en

un periodo estimado de 58 000 años. Estas diferencias geográficas podrían ayudar a explicar la incidencia de *H. pylori* asociada a diferentes patologías (Falush 2003).

- **INSERCIÓN DE 180 PARES DE BASES:** se ha descrito una secuencia de inserción de 180 pares de bases que se encuentra en la cepa J99 y no se encuentra en la cepa 266695. Esta inserción ha sido observada en un mayor porcentaje de cepas procedentes de África, que en cepas de pacientes procedentes de otras áreas geográficas (McNulty 2004).
  
- **LA PROTEÍNA HspA (Heat Shock Protein):** en *Helicobacter pylori* se han descrito dos proteínas denominadas “proteínas de choque térmico”. Ambas proteínas son homologas pero con diferentes características antigénicas. HspA (Heat Shock Protein A) es una proteína de 13 KDa y HspB (Heat Shock Protein B) es una proteína de 58 KDa. Mientras que HspB y los primeros 90 aminoácidos de HspA (dominio A) son homólogos a otras bacterias, HspA contiene una única región terminal de 27 aminoácidos ricos en histidina que se denomina dominio B. Estudios experimentales han demostrado que la región rica en histidina envuelve la actividad ureásica, secundaria a uniones de níquel. Hay pocos trabajos publicados acerca de esta proteína pero lo que sí ha sido estudiado previamente es la relación en la diversidad del dominio B de la proteína HspA y los orígenes geográficos de las cepas (Enders 1999).

# **OBJETIVOS**



1. Detectar la presencia de *Helicobacter pylori* y su resistencia a claritromicina en muestras de biopsias gástricas mediante métodos moleculares, utilizando PCR en tiempo real y PCR convencional con posterior hibridación.
2. Estudiar la sensibilidad a claritromicina de los aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* en el año 2008 y su asociación con factores del paciente (edad, lugar de nacimiento y tratamiento previo frente a *H. pylori*).
3. Detectar la mutación responsable de la resistencia a claritromicina en la región 23S RNAr mediante PCR-RFLP y secuenciación y comparar los resultados con los métodos fenotípicos.
4. Conocer la prevalencia de diferentes genes asociados a virulencia en los diversos aislamientos clínicos mediante amplificación por PCR: *vacA* (alelos *s1* o *s2*, *m1* o *m2* e *i1* o *i2*) y *cagA* (EPIYA “motifs”).
5. Estudiar la relación entre los diversos aspectos estudiados (sensibilidad a claritromicina y genes virulencia) y comparar los resultados obtenidos entre los pacientes del año 1994 y los del 2008.
6. Estudiar la presencia de genes informativos y relacionarlos con la procedencia geográfica de los pacientes.

# **MÉTODOS**

### **3.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS:**

#### **3.1.1 Estudio de biopsia gástrica mediante PCR a tiempo real.**

Se estudiaron 106 muestras de biopsias obtenidas de pacientes pediátricos con síntomas gástricos que fueron recibidas en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa entre Diciembre del 2007 y Junio del 2008, procedentes de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Infantil del Niño Jesús y del Hospital Universitario Doce de Octubre.

#### **3.1.2 Estudio de biopsia gástrica mediante PCR e hibridación en tiras de nitrocelulosa.**

Se estudiaron 61 muestras de biopsias obtenidas de pacientes pediátricos con síntomas gástricos que fueron recibidas en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa entre Marzo y Diciembre del 2008, procedentes de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Infantil del Niño Jesús y del Hospital Universitario Doce de Octubre.

#### **3.1.3 Estudio de resistencia a claritromicina y su asociación con los factores de virulencia en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* en el año 2008.**

Se estudiaron un total de 118 aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* recibidos en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario La Princesa entre Junio y Diciembre del 2008. De ellos 61 (52.7%) pertenecían a adultos y 59

(47.3%) a pacientes pediátricos. 78 (66.1 %) aislamientos clínicos procedían de mujeres y 40 (33.9%) de hombres. 90 (76.3%) aislamientos procedían de pacientes nacidos en España, y 28 (23.7%) de pacientes nacidos fuera de España. 24 (20.3%) de los pacientes habían recibido tratamiento previo para la infección por *H. pylori*.

#### **3.1.4 Estudio de factores de virulencia de aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* en el año 1994.**

Se estudiaron un total de 64 aislamientos de *Helicobacter pylori* aislados de diferentes regiones de España.

<u>PROCEDENCIA</u>	<u>NÚMERO</u>
ALMERÍA	20
AVIÉS	6
IBIZA	16
MADRID	22

Los aislamientos procedían de los siguientes hospitales: Hospital Nuestra Señora de La Inmaculada (Almería), Hospital San Agustín (Avilés), Hospital Can Misses (Ibiza) y Hospital de la Princesa (Madrid). Todos ellos recibidos en el Departamento de Microbiología durante el año 1994.

## **3.2 TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

Las biopsias obtenidas por endoscopia se recogieron en un tubo estéril con 1ml de solución salina para impedir su desecación y se enviaron lo más rápidamente posible al Servicio de Microbiología del Hospital de la Princesa, dónde fueron procesadas antes de 3 horas.

## **3.3 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.**

### **3.3.1 Cultivo de la biopsia gástrica.**

Las biopsias se recogieron con una torunda estéril y la siembra se realizó rotando repetidas veces la porción de la biopsia sobre la superficie de los medios de cultivo usados:

- una placa de Agar sangre (Columbia Agar, con 5% de sangre de oveja; BioMérieux), que se incubó en microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>). Se incubaron hasta 15 días, observándolas periódicamente con el fin de detectar el crecimiento de colonias sugestivas de *H. pylori*.

- una placa de medio selectivo de Agar *Pylori* (*Pylori* Agar; BioMérieux) incubadas hasta 15 días a 37° en una atmósfera de microaerofilia (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>).

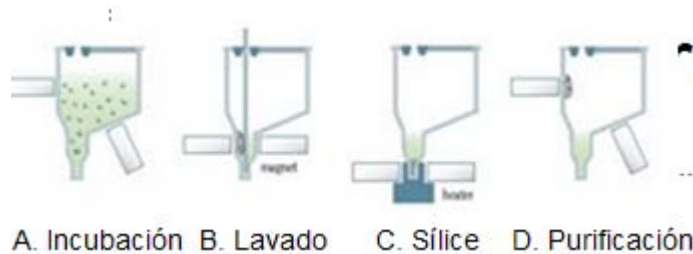
Una vez extendida bien la biopsia por el agar, la torunda usada se introdujo en 1 ml de caldo de urea de Christensen para comprobar su actividad ureásica. El resto de biopsia restante, se congeló para su conservación a -80° para estudios posteriores.

Los aislamientos fueron identificados como *H. pylori* basados en la morfología de la colonia, que es de aspecto pequeña, gris y translúcida; reacciones químicas como ureasa, catalasa y oxidasa positivas y observándose una morfología de bacilo curvado Gram negativo en la tinción de Gram.

Para conservarlas se necesitó una placa de cultivo con abundante crecimiento, de donde se recogió el microorganismo con torunda y se depositó en 2 ml de caldo de tripticasa soja con 15% de glicerol, luego se dividió en 2 criotubos de 1 ml cada uno.

### **3.3.2 Extracción de DNA cromosómico a partir de la biopsia gástrica o a partir de cepas del año 2008.**

Se utilizó el NucliSens® easyMAG™ que es un sistema de segunda generación de bioMérieux para el aislamiento automatizado de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas, basada en la tecnología de extracción con sílice (también denominada tecnología BOOM®). Mediante la introducción de partículas magnéticas y la optimización de los reactivos, este sistema mejora significativamente la tecnología BOOM®. La plataforma puede aislar con eficacia el ácido nucleico a partir de numerosos volúmenes y distintos tipos de muestras. De este aislamiento se consigue un ácido nucleico puro, de gran calidad, compatible con numerosas técnicas moleculares que pueden utilizarse posteriormente.



El procedimiento de trabajo es el siguiente:

- Se realiza un pretratamiento de las muestras:
  - Se añaden 40  $\mu$ l de proteinasa K.
  - Se añaden 40  $\mu$ l de buffer de lisis.
  - Se añaden 320  $\mu$ l de agua destilada.
  - Se incuba toda la noche a 37°C.
- Se inicia el sistema y el programa easyMag.
- Se transfiere la muestra a una cubeta que se coloca en el easyMag.
- Se prepara la mezcla sílice-calibrador.

Se adicionan 500  $\mu$ l del buffer.

Se adicionan 550  $\mu$ l de sílice.

- Se adiciona la mezcla de sílice-calibrador a la cubeta con muestra.
- Cuando la serie ha acabado se transfiere el eluido para conservarlo a -80 °C o para realizar la PCR.

Para la extracción a partir de cepa se utilizó un cultivo en medio sólido de 48 horas, se realizó una suspensión en 200  $\mu$ l de solución salina y se sometió directamente al procedimiento de extracción del easyMag.

### 3.3.3 Extracción de DNA cromosómico a partir de cepa en el año 1994.

- Inocular en un tubo *eppendorf* que contenga un 1 ml de tampón TE el contenido de 1 ó 2 placas de un cultivo reciente (48 h) de *H. pylori*.
- Centrifugar el tubo en una microcentrífuga durante 5 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante. Añadir el tampón y proteinasa K con una concentración final de 100  $\mu$ l/ml. Mezclar bien e incubar a 37° C durante 1 hora.
- Añadir 100  $\mu$ l de NaCl, 80  $\mu$ l de la solución CTAB/NaCl (10% CTAB en 0.7 M NaCl), mezclar enérgicamente e incubar durante 10 minutos a 65 ° C.
- Añadir de 0.7 a 0.8 ml de cloroformo/isoamilalcohol (24:1), mezclando enérgicamente.
- Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm y separar el sobrenadante (fase acuosa) en un tubo *eppendorf* nuevo.
- Añadir fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1), mezclar bien y volver a centrifugar, 5 minutos a 12.000 rpm.
- Separar el sobrenadante en un tubo nuevo y añadir un volumen de 0.6 ml de isopropanol para la precipitación del DNA. Mover el tubo suavemente hasta observar claramente el precipitado.
- Conservar el precipitado a – 20 ° C durante 1 hora.
- Centrifugar el tubo durante 5 minutos a 12.000 rpm. Añadir 1 ml de etanol con el fin de lavar el DNA. Centrifugar durante 5 minutos a 12.000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y secar a 37° C. Resuspender el sedimento en 100  $\mu$ l de tapón TE disolviendo el DNA.



### **3.4 ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD *in vitro*.**

#### **3.4.1 Difusión en placa con disco y E-test.**

Se estudió la sensibilidad a amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, claritromicina, rifampicina y ciprofloxacino. En el caso de los dos primeros se utilizó la difusión en disco y para el resto E-test. Se realizan en placas de Agar sangre, una para los discos de amoxicilina y tetraciclina y una para cada E-test. Las placas fueron inoculadas con torunda por toda la placa y posteriormente se depositaron los discos o el E-test. Se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. A los tres días de incubación se realizó una primera lectura y a los cinco días la lectura definitiva.

#### **3.4.2 Puntos de corte utilizados.**

Se usaron los puntos de corte establecidos por la CLSI (CLSI 2009) y otras publicaciones previas. Las cepas fueron consideradas resistentes si tenía una CMI  $\geq 2$ mg/L para amoxicilina; CMI  $\geq 4$ mg/L para tetraciclina; CMI  $\geq 8$ mg/L para metronidazol; CMI  $\geq 1$ mg/L para claritromicina; CMI  $\geq 4$ mg/L para ciprofloxacino y CMI  $\geq 32$ mg/L para rifampicina. Las cepas fueron consideradas de sensibilidad intermedia a claritromicina y ciprofloxacino si tenían una CMI=0.5mg/L y CMI=2mg/L, respectivamente (Procedimientos SEIMC).

### **3.4.3 Método genotípico para la detección de resistencia a la claritromicina mediante PCR en tiempo real (Light Cycler) a partir de biopsia gástrica.**

Se utilizó para el presente trabajo el kit MutaREAL® *Helicobacter pylori* para detectar la presencia de *H. pylori* y cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina. Este método se basa en la amplificación de un fragmento del gen 23S RNAr de *H. pylori*, el método consiste en una amplificación y la subsiguiente detección de mutantes mediante la hibridación con sondas y el análisis de la curva de la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados.

El procedimiento es el siguiente:

- 2 µl del reactivo que contiene las enzimas.
- 14.4 µl del reactivo que contiene los primers, en el buffer de reacción.
- 1.6 µl de MgCl<sub>2</sub>.
- 2 µl de:
  - la muestra problema.
  - el control positivo con una cepa sensible a claritromicina.
  - el control positivo con una cepa resistente a claritromicina.
  - el control negativo.

El protocolo seguido por el termociclador es el siguiente:

- Fase de preincubación a 95°C durante 10 minutos.

- Fase de amplificación con 45 ciclos de amplificación a 95 °C, 55 °C y 72 °C durante 10, 10 y 15 segundos respectivamente, con lectura de fluorescencia a 55°C.
- Fase de detección: 95 °C, 50 °C y 80 °C a 10, 5 y 5 segundos respectivamente.

Tras la finalización del proceso, se detectará amplificación de DNA si la biopsia es *H. pylori* positiva. Mediante la temperatura de melting (Tm) en los fragmentos amplificados permitirán la detección de resistencia a claritromicina:

- Tm en el canal F2 fue 64.5°C para la cepa salvaje y 60.5°C para las mutantes resistentes.
- Tm en el canal F3 fue 59.5°C para la cepa salvaje y 66.5°C para cepas mutadas.

#### **3.4.4 Método genotípico para la detección de resistencia a la claritromicina mediante PCR e hibridación con sondas específicas a partir de biopsia gástrica.**

El sistema de kit comercial Genotype® HelicoDR consiste en una técnica de amplificación seguida de una hibridación del producto amplificado con sondas específicas en tiras de nitrocelulosa. Se realiza en tres pasos: el primero es la extracción de DNA como se ha explicado previamente mediante el easyMag (BioMérieux), el segundo paso es la realización de la amplificación y el último paso sería la detección mediante la hibridación en las tiras de nitrocelulosa.

## Métodos.

---

La mezcla para realizar la amplificación consiste en:

- 35  $\mu$ l de PMN (es una mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos con presencia de un marcador, biotina)
- 5  $\mu$ l de buffer.
- 2.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$ .
- 2.5  $\mu$ l de agua destilada.
- 0.4  $\mu$ l de *Taq* polimerasa.
- 5  $\mu$ l del DNA.

Las condiciones de la amplificación son las siguientes:

Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	5 min
<u>30 ciclos:</u>	94	30 s
	55	30 s
	72	30 s
<u>1 ciclo:</u>	72	7 min

La hibridación y la detección fue realizada en un sistema automático (AutoLIPA, Siemens) y siguiendo el siguiente protocolo:

- 20  $\mu$ l de la solución desnaturizante.
- Se añade 20  $\mu$ l del producto amplificado.
- Se pone en contacto la mezcla anterior con 1 ml de la solución de hibridación durante 30 min a 45 °C.
- Se añade 1 ml de la solución de lavado durante 15 min a 45 °C.

## Métodos.

---

- Se añade 1 ml de la solución de enjuague 1 min.
- Se añade 1 ml del conjugado durante 30 min.
- Se añade 1 ml del sustrato durante 20 min.
- Se para la reacción con agua destilada, y se pueden interpretar las tiras de nitrocelulosa con las bandas.

Cada tira contiene un total de 13 sondas de hibridación. La primera banda contiene el control de conjugado diseñado para indicar que ha sido efectiva la unión con el sustrato. La segunda banda incluye un control universal diseñado para detectar todas las bacterias gram positivas con alto contenido en G+C, esta banda es utilizada para comprobar que la amplificación ha tenido lugar correctamente. La tercera banda contiene una secuencia que amplifica una región del 23S RNAr que es común a todas las cepas de *Helicobacter pylori*. Las diez bandas siguientes son para el estudio de la sensibilidad a quinolonas, y las cinco siguientes para ver el estudio de la sensibilidad a claritromicina.

### 3.4.5 Método para la detección de resistencia a la claritromicina mediante secuenciación.

La detección de un producto amplificado de 329 pares de bases situado entre las posiciones 1891 - 2220 de la secuencia previamente publicada del gen 23S RNAr.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región amplificada	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
23S rRNA	23S RNA F	5'CCACAGCGATGTGGTCTCAG	329
	23S RNA R	5'CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	

Condiciones de la reacción:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer 23S RNAr-F	1 $\mu$ l
Primer 23S RNAr-R	1 $\mu$ l
Taq- polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

Ciclos de amplificación	Temperatura °C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	30 s
	60	30 s
	72	30 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

El producto amplificado fue purificado usando el kit de purificación “QIAquick PCR purification” (QUIAGEN, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante:

- 40  $\mu$ l del producto amplificado se mezcla con 200  $\mu$ l de un buffer de unión al DNA.
- 30 s de centrifugación a 13000 revoluciones por minuto.
- Se deshecha el sobrenadante y se añade 750  $\mu$ l de un buffer de lavado al DNA unido a la membrana.
- 1 min de centrifugación a 13000 revoluciones por minuto.
- Se deshecha el sobrenadante y se añade 50  $\mu$ l de un buffer de elución.
- 1 min de centrifugación a 13000 revoluciones por minuto.
- Se tira la columna y se recoge el producto restante, que es el DNA purificado.

8  $\mu$ l del producto amplificado purificado se mezclaron con 2  $\mu$ l del primer 23S RNAr-F y otros 8  $\mu$ l con 2 del primer 23S RNAr-R, ambos primers preparados a una concentración de 5 pmoles/  $\mu$ l. La mezcla se envió para secuenciar a la empresa MACROGENUSA (Nueva York, USA), dónde se hizo la reacción en un secuenciador automático, BigDye TM (USA).

Los alineamientos de las secuencias múltiples de DNA se realizaban mediante el programa CLUSTALW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)) y con el programa GENEDOC ([www.nrbcs.org/gfx/genedoc](http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc)) se visualizaban los alineamientos para su posterior estudio.

### 3.4.6 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante PCR convencional con un producto amplificado mayor.

Detección de un producto amplificado de 695 pares de bases situado entre las posiciones 2057 – 2752 del gen 23S RNAr. Se diseñaron estos primers que amplificaban un producto más grande del gen 23S RNAr que los anteriores, para poder buscar mutaciones que confieran resistencia a claritromicina en este gen, en cepas con las que tuvimos discrepancias entre el E-test y el método genotípico.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región amplificada	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
23S RNAr	23S RNA F	5'TCCTCTCGTACTAGGGA	695
	23S RNA R	5'CTGCATGAATGGCGTAACGAG	

Condiciones de amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer 23S' RNAr-F	1 $\mu$ l
Primer 23S' RNAr-R	1 $\mu$ l
Taq - polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l



Ciclos de amplificación	Temperatura °C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	45 s
	49	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

El producto amplificado fue secuenciado siguiendo el protocolo antes descrito para la secuenciación.

#### 3.4.7 Método genotípico para detección de resistencia a la claritromicina mediante RFLP-PCR con enzimas de restricción.

Se realizó una PCR descrita previamente (Versalovic 1996) para detectar un fragmento del gen 23S RNAr.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región amplificada	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
23S RNAr	23S RNA F	5'CCACAGCGATGTGGTCTCAG	Digestión: 304 y 100
	23S RNA R	5'CTCCATAAGAGCCAAAGCCC	

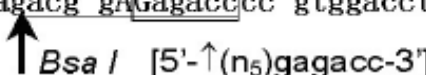
Condiciones de la amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer 23S'' RNAr-F	1 $\mu$ l
Primer 23S'' RNAr-R	1 $\mu$ l
Taq - polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	1 min
	60	1 min
	72	1 min
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

#### 3.4.7.1 Digestión con la enzima de restricción *BsaI*.

Dos  $\mu$ l del producto amplificado fueron añadidos a un tubo *eppendorf* de 1.5 ml con 8  $\mu$ l de agua, 2  $\mu$ l de la enzima *BsaI* (*Bacillus stearothermophilus*) (BIOLABS, New England) con una concentración de 5,000 U/ml y 5  $\mu$ l del tampón 10x recomendado por el fabricante de la enzima. La mezcla fue incubada durante 24 horas a 50° C.

2131-cggcaagacg gAAgacccc gtggaccttt-2150	23S rRNA Wildtype
2131-cggcaagacg gAGagacccc gtggaccttt-2150	A2143G Mutant
	

### 3.5. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA.

#### 3.5.1 Detección del gen *vacA* de *Helicobacter pylori*.

##### 3.5.1.1 Región *s* y *m*:

La detección de los alelos del gen *vacA* se realizó mediante una técnica de PCR siguiendo el protocolo expuesto en la siguiente tabla, previamente descrito por Atherton (Atherton 1995).

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región Amplificada	Genotipo identific	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
Región media	m1/m2	VACM-F	5'CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	290/350
		VACM-R	5'TGAGGTTGTTTGATATTGAC	
Región señal	s1/s2	VACS-F	5'ATGGAAATACAACAAACACAC	176/200
		VACS-R	5'CCTGAGACCGTTCCTACAGC	

Condiciones de la amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer <i>vacA</i> s o m-F	1 $\mu$ l
Primer <i>vacA</i> s o m-R	1 $\mu$ l
Taq – polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	5 min
<u>30 ciclos:</u>	95	45 s
	52	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	7 min

### 3.5.1.2 Región *i*:

La detección de un tercer alelo del gen *vacA* se realizó mediante una técnica de PCR siguiendo el protocolo expuesto.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región Amplificada	Genotipo identificado	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
Región intermedia	<i>i1/i2</i>	<i>Vac i</i> -F	5'GTTGGGATTGGGGGAATGCCG	426/432
		<i>Vac i</i> -R	5'TGTTTATCGTGCTGTATGAAGG	

Condiciones de la amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 µl
10x PCR Buffer	5 µl
dNTPs (2.5 Mm)	4 µl
Primer <i>vacA i</i> -F	1 µl
Primer <i>vacA i</i> -R	1 µl
Taq – polimerasa	0.25 µl
DNA	1 µl
Volumen final	50 µl

Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	95	90 s
<u>30 ciclos:</u>	95	45 s
	57	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

El producto amplificado fue secuenciado siguiendo el protocolo descrito para la secuenciación.

### 3.5.2 Detección del gen *cagA* de *Helicobacter pylori*

Detección de un producto amplificado entre las posiciones 1751-2048 del gen *cagA*.

En el caso de las cepas *cagA* negativas, para confirmar que realmente no es un falso negativo, se hizo una PCR para la amplificación del “empty site” con los primers que se detallan en la siguiente tabla. Si no se obtuvieron productos amplificados ni para el *cagA* ni para el “empty site”, se hicieron otras dos amplificaciones para ver si tenían sólo parcialmente el *cagA* (*cagA* left y *cagA* right).

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región amplificada	Genotipo identific	Diseño del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR (bp)
CagA	CagA	<i>Cag</i> AGREEK-F	5'TTTAGCTTCTGATACCGC	EPIYA motifs
		<i>Cag</i> AGREEK-R	5'GTTAARAATRGTGTRAAYGG	
Empty-site	Empty-site	EMPTY-SITE-F	5'CCAAATACATTTTGGCTAAATAAAC	550-560
		EMPTY-SITE-R	5'CTCTTTTTGTGCCTTTGATTGAA	
CagA left	CagA left	EMPTY-SITE-F	5'CCAAATACATTTTGGCTAAATAAAC	EPIYA motifs
		EMPTY-LEFT-R	5'GCTTATCAGTCAAATTGTTTTT	
CagA right	CagA right	EMPTY-RIGHT-F	5'GGCTCAAGTCGTGAATGAT	EPIYA motifs
		EMPTY-SITE-R	5'CTCTTTTTGTGCCTTTGATTGAA	

Condiciones de la amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer <i>cagA</i> -F	1 $\mu$ l
Primer <i>cagA</i> -R	1 $\mu$ l
Taq – polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	50 $\mu$ l

<u>Ciclos de amplificación para PCR del gen <i>cagA</i></u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	5 min
<u>30 ciclos:</u>	94	45 s
	50	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

<u>Ciclos de amplificación para PCR de la región “empty-site”</u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	1 min
	56	1 min
	72	1 min
<u>1 ciclo:</u>	72	1 min

<u>Ciclos de amplificación para PCR de los bordes del gen <i>cagA</i></u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	1 min
	58	1 min
	72	1 min
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

El producto amplificado del gen *cagA* fue secuenciado siguiendo el protocolo antes descrito para la secuenciación para poder determinar el número de “EPIYA motifs” presentes en las cepas *cagA* positivas.

### 3.6 ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE GENES INFORMATIVOS DE *Helicobacter pylori* Y SU RELACIÓN CON LA PROCEDENCIA GEOGRÁFICA.

#### 3.6.1 Detección del gen *HspA* de *Helicobacter pylori*.

La proteína de “choque térmico” (heat shock protein) de *Helicobacter pylori* tiene unos dominios que pueden resultar interesantes para el estudio de la procedencia geográfica de las diferentes cepas aisladas.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

Región amplificada	Primer diseñado	Primer secuencia	Tamaño del PCR producto
HspA	HspA F	5'TGCGCTATAGTTGTGTCGC	250
	HspA R	5'GCTATCTGAAAATTTGATTCTTTTGC	

Condiciones de amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer <i>hspA</i> -F	1 $\mu$ l
Primer <i>hspA</i> -R	1 $\mu$ l
Taq – polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l



Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	1 min
	52	1 min
	72	2 min
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

El producto amplificado fue secuenciado siguiendo el protocolo descrito para la secuenciación para poder determinar las diferentes procedencias de las cepas aisladas.

### 3.6.2 Detección de la presencia de *ins180* pb.

Se estudio la presencia de la secuencia de inserción de 180 pb del genoma de *Helicobacter pylori*, que se ha relacionado con cepas de origen africano.

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

región amplificada	Primer diseño	Primer secuencia	Tamaño del producto de PCR (bp)
<i>ins180</i> pb	Ins180-F	5'GCAAAAACCTCGCTCAAAAACCTC	610
	Ins180-R	5'AAGAAAACCCACGCAAG	

Condiciones de la amplificación:

COMPONENTE	VOL/REACCIÓN
Agua	37.5 $\mu$ l
10x PCR Buffer	5 $\mu$ l
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l
Primer <i>ins180</i> -F	1 $\mu$ l
Primer <i>ins180</i> -R	1 $\mu$ l
Taq – polimerasa	0.25 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ l
Volumen final	50 $\mu$ l

Ciclos de amplificación	Temperatura°C	Tiempo
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	45 s
	57	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

### 3.7 MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Es una base de datos de secuencias de nucleótidos de distintas cepas de microorganismo. Se realizó MLST con cepas representativas de cada grupo y con los primers propuestos en la página [www.mlst.net](http://www.mlst.net).

Primers propuestos para obtener la secuencia MLST.

<i>atpA</i> -F	5'GGACTAGCGTTAAACGCACG
<i>atpA</i> -R	5'CTTGAAACCGACAAGCCAC
<i>efp</i> -F	5'GGCAATTTGGATGAGCGAGCT
<i>efp</i> -R	5'CTTCACCTTTTCAAGATACTC
<i>mut</i> -F	5'GTGGTTGTAGYTGGAACTTTACAC
<i>mut</i> -R	5'CTTAAGCGTGTGTYTTTCTAGG
<i>ppa</i> -F	5'GGAGATTGCAATGAATTTAGA
<i>ppa</i> -R	5'GTGGGGTTAARATCGTTAAATTG
<i>trpC</i> -F	5'TAGAATGAAAAAAGCATCGCCCTC
<i>trpC</i> -R	5'TAAGCCCGCACACTTTATTTTCGCC
<i>urel</i> -F	5'AGGTTATTCGTAAGGTGCG
<i>urel</i> -R	5'GTTTAAATCCCTTAGATTGCC
<i>yphC</i> -F	5'CACGCCTATTTTTTTGACTAAAAAC
<i>yphC</i> -R	5'CATTYACCCTCCCAATGATGC

Condiciones de amplificación:

<u>Ciclos de amplificación</u> <u>para: <i>mutY</i>, <i>ppa</i>, <i>urel</i>.</u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	30 s
	55	30 s
	72	30 s
<u>1 ciclo:</u>	72	2 min

<u>Ciclos de amplificación</u> <u>para: <i>atpA</i>, <i>yphC</i>.</u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	45 s
	58	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

<u>Ciclos de amplificación</u> <u>para: <i>efp</i>, <i>trpC</i></u>	<u>Temperatura°C</u>	<u>Tiempo</u>
<u>1 ciclo:</u>	94	1 min
<u>30 ciclos:</u>	94	45 s
	57	45 s
	72	45 s
<u>1 ciclo:</u>	72	5 min

### **3.8 DETECCIÓN DE LOS RESULTADOS.**

Los resultados de las amplificaciones convencionales fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 1.5%. Se utilizó como marcador de peso molecular de Qiagen (USA) que podía detectar tamaños desde 0 a 1000 pares de bases.

Posteriormente los resultados fueron detectados mediante un transiluminador de luz ultravioleta UV 302 nm con visor de 21 x 26cm de Qiagen (USA).

### **3.9 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:**

Se aplicó el método de chi cuadrado para el estudio estadístico y la relación entre los diferentes datos obtenidos, con el programa EPI INFO (**Epi Info**, [www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo)).

# **RESULTADOS**

#### 4.1 PCR A TIEMPO REAL EN MUESTRAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS.

Se estudiaron 106 muestras de biopsias obtenidas de pacientes pediátricos con síntomas gástricos a las que se realizó la PCR en tiempo real (RT-PCR) para ver la presencia de *H. pylori* y detectar la resistencia a claritromicina. 66 (62%) de las 106 biopsias incluidas en este estudio fueron positivas para *H. pylori* por cultivo y/o PCR. 56 pacientes que fueron positivos para *H. pylori*, tuvieron concordancia en sus resultados tanto por cultivo como por PCR y 40 muestras de biopsia tuvieron resultados negativos concordantes. 6 biopsias fueron positivas por PCR pero negativas por cultivo y 4 fueron negativas por PCR y el cultivo fue positivo, como se puede ver en la tabla adjunta.

Tabla 4.1 a- Comparación de dos métodos para el diagnóstico de *H. pylori* en muestras de biopsia.

	Cultivo positivo	Cultivo negativo
RT-PCR positiva	56 (53%)	6 (6%)
RT-PCR negativa	4 (4%)	40 (37%)

De las 106 biopsias estudiadas, 44 cepas fueron negativas para *H. pylori* mediante la PCR a tiempo real y se comprobó que eran verdaderos negativos mediante la amplificación por PCR de DNA del gen de la  $\beta$ -globulina humana usando el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I® Roche. En todas estas muestras negativas hubo amplificación de dicho DNA.

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de esta PCR a tiempo real se pueden ver en la siguiente tabla.

Tabla 4.1 b- Sensibilidad, especificidad y los valores predictivos positivos y negativos del “MutaReal® *Helicobacter pylori*” kit para detectar *H. pylori*.

<u>Detección de <i>H. pylori</i></u>	
<u>Especificidad (%)</u>	<b>87</b>
<u>Sensibilidad (%)</u>	<b>93</b>
<u>PPV (%)</u>	<b>91</b>
<u>NPV (%)</u>	<b>91</b>

#### 4.1.1 Detección de resistencia a claritromicina mediante PCR a tiempo real.

De las 60 muestras de biopsia que tuvieron resultado positivo para *H. pylori* por cultivo, 33 (55%) fueron infectados por una cepa sensible y 27 (45%) con una cepa resistente a claritromicina, determinada la sensibilidad mediante E-test. De las 56 muestras que tuvieron resultados concordantes mediante cultivo y PCR, 32 (57%) fueron infectadas con una cepa sensible a claritromicina y 24 (42%) con una cepa resistente. El genotipo de resistencia a claritromicina fue confirmado en 23 de las 24 biopsias resistentes a dicho antibiótico por PCR a tiempo real (los picos de la temperatura de fusión fueron desde 56.7 a 60.7°C en el canal F2, como podemos ver en la gráfica 4.5.1 c.



## Resultados

---

Las cepas sensibles a claritromicina fueron confirmadas en 29 de los 32 casos mediante PCR. Se observaron discrepancias en 3 casos, en los que se obtuvo genotipo resistente mediante PCR a tiempo real mientras que fueron sensibles por E-test. Todos estos datos vienen especificados en la siguiente tabla.

## Resultados

Tabla 4.1.1 a Comparación de los datos obtenidos mediante PCR a tiempo real y el cultivo de biopsia.

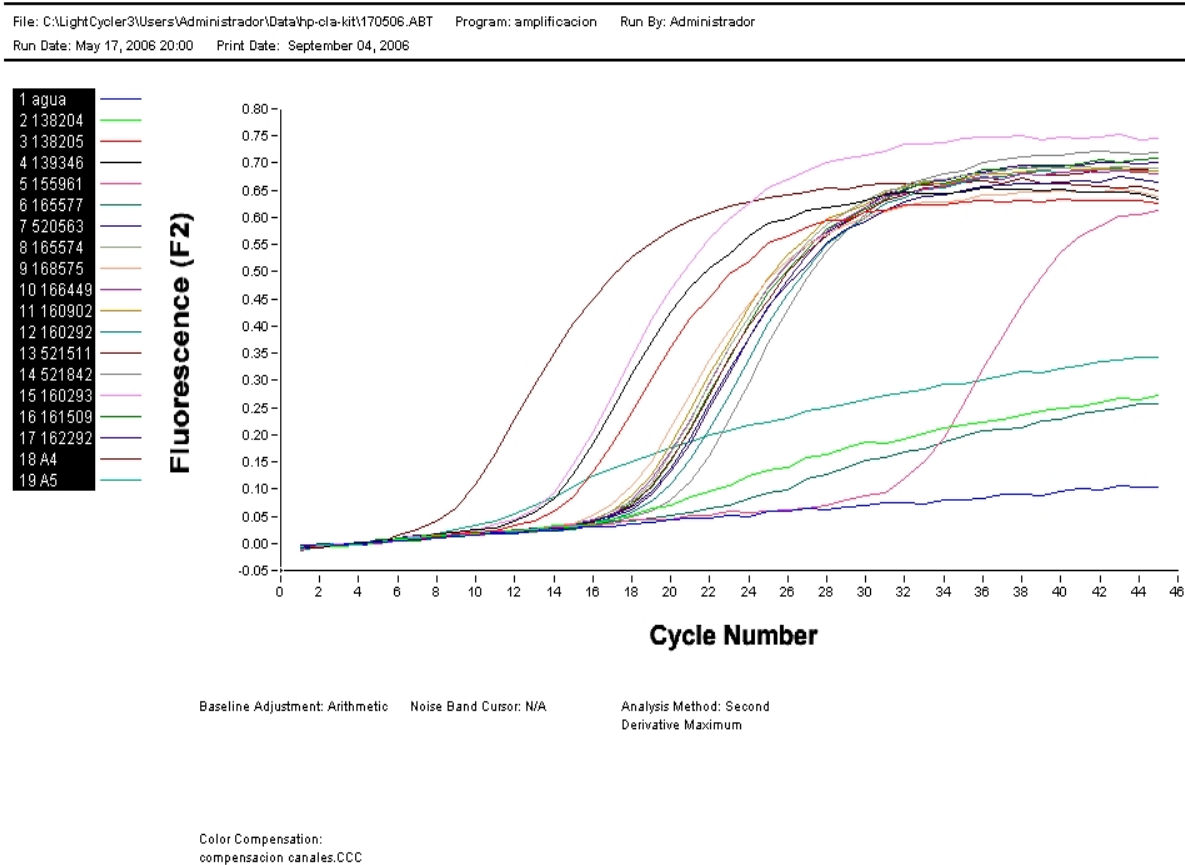
Número de pacientes	<u>Cultivo de la biopsia</u>		<u>Real-time PCR</u>		
	Cultivo	E-test	Resultado	Genotipo Mutado	Genotipo wild-type
29	+	S	+		+
23	+	R	+	+	
3	+	S	+	+	
1	+	R	+		+
3	+	R	-		
1	+	S	-		
4	-	-	+	+	
2	-	-	+		+
40	-	-	-		

Tabla 4.1.1 b Sensibilidad, especificidad y los valores predictivos del “MutaReal® *Helicobacter pylori*” para detectar resistencia a claritromicina.

	<u>Detección de resistencia a claritromicina.</u>
<u>Especificidad (%)</u>	<b>96</b>
<u>Sensibilidad (%)</u>	<b>91</b>
<u>PPV (%)</u>	<b>97</b>
<u>NPV (%)</u>	<b>88</b>

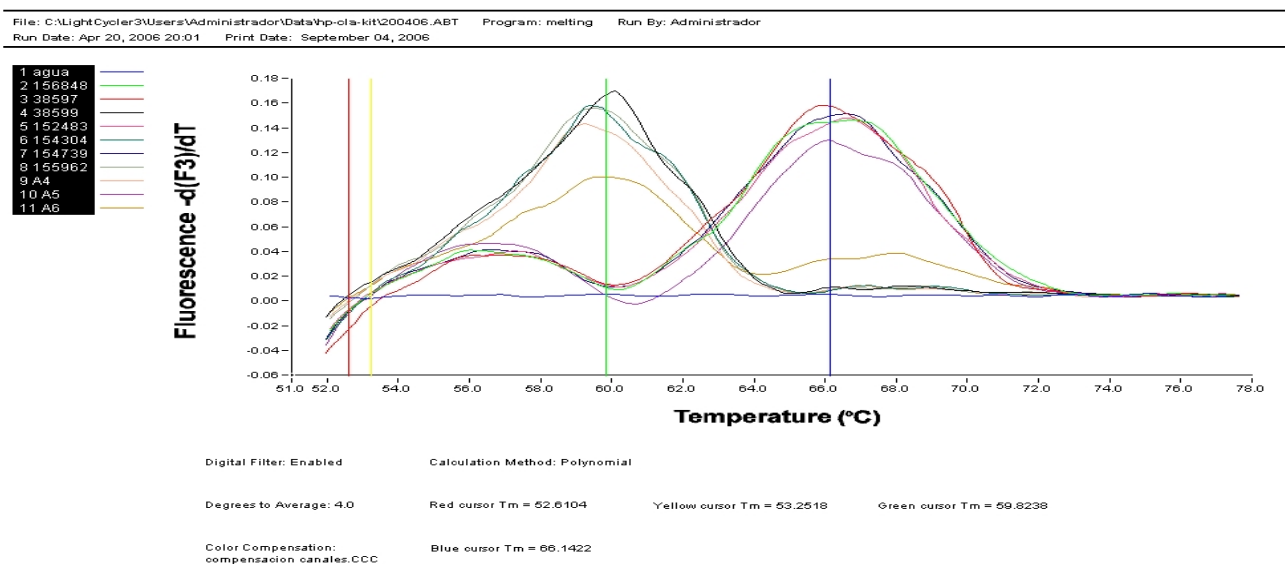
## Resultados

Gráfica 4.1.1 a- Amplificación de DNA de diferentes cepas de *H. pylori* y los controles positivos (A4 y A5).

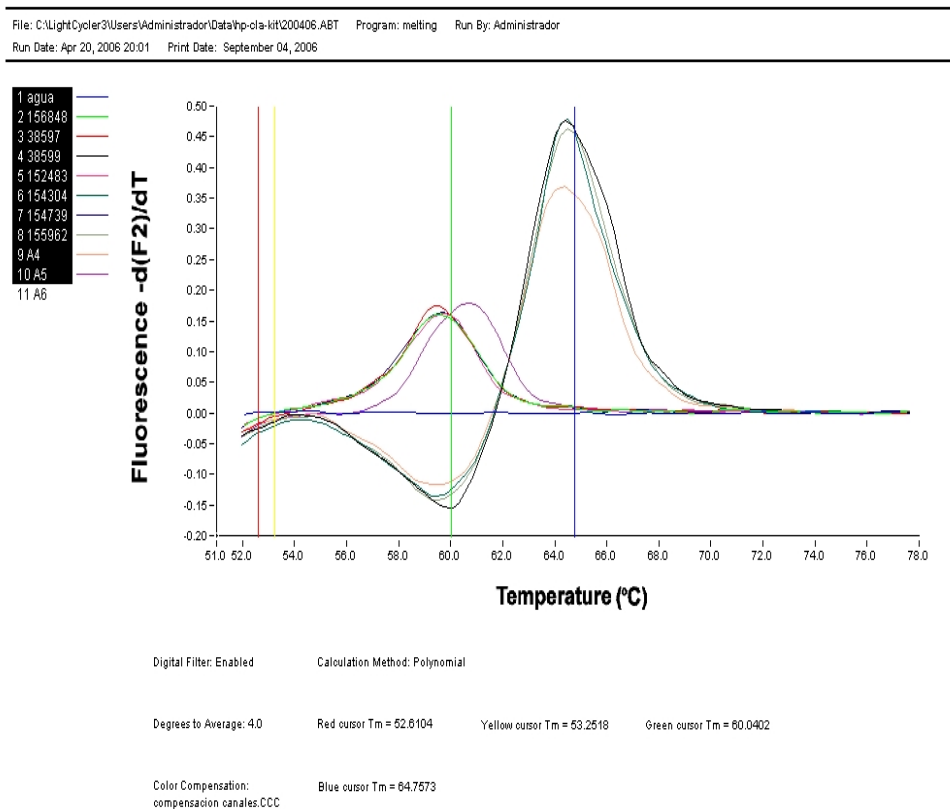


## Resultados

Gráfica 4.1.1 b- Temperatura de fusión ( $T_m$ ) en el canal F2 de diferentes cepas de *H. pylori* y los controles positivos (A4 y A5)



Gráfica 4.1.1 c- Temperatura de fusión ( $T_m$ ) en el canal F3 de diferentes cepas de *H. pylori* y los controles positivos (A4 y A5)



## 4.2 TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN E HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS A PARTIR DE BIOPSIA GÁSTRICA.

Se estudiaron 63 muestras de biopsias obtenidas de pacientes pediátricos con síntomas gástricos a las que se les realizó una PCR convencional con posterior revelado mediante hibridación para ver la presencia de *H. pylori* y detectar la resistencia a claritromicina. 24 (38.1%) de las 63 biopsias incluidas en este estudio fueron positivas para *H. pylori* por cultivo y tuvieron concordancia en sus resultados por PCR. 27 muestras de biopsia tuvieron resultados negativos concordantes entre biología molecular y cultivo. 11 biopsias fueron positivas mediante este método genotípico, pero negativas por cultivo y 1 fue negativa por biología molecular pero el cultivo fue positivo, como se puede ver en la tabla adjunta.

Tabla 4.2 a- Comparación de dos métodos para el diagnóstico de *H. pylori* en muestras de biopsia.

	Cultivo positivo	Cultivo negative
PCR-hibridación positiva	24 (38.1%)	11 (17.5%)
PCR-hibridación negativa	1 (1.5%)	27 (42.9%)

## Resultados

La sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos de este método genotípico basado en la amplificación y la posterior hibridación se pueden ver en la siguiente tabla.

Tabla 4.2 b- Sensibilidad, especificidad y los valores predictivos para el “GenoType ® HelicoDR” para la detección de *H. pylori*.

	<u>Detección de <i>H. pylori</i></u>
<u>Especificidad (%)</u>	<b>71</b>
<u>Sensibilidad (%)</u>	<b>96</b>
<u>PPV (%)</u>	<b>69</b>
<u>NPV (%)</u>	<b>96</b>

#### **4.2.1 Detección de resistencia a claritromicina mediante PCR convencional y posterior hibridación.**

De las 24 muestras de biopsia que tuvieron resultado positivo para *H. pylori* por cultivo, 13 (54.1%) pacientes estaban infectados por una cepa sensible a claritromicina y 11 (45.9%) con una cepa resistente, habiéndose determinado la sensibilidad a claritromicina mediante E-test. Todas las cepas sensibles a claritromicina fueron confirmadas mediante este método de biología molecular a partir de biopsia como sensibles a dicho antibiótico, excepto una muestra de biopsia que resultó ser resistente a claritromicina. Dos de las muestras sensibles a claritromicina mediante E-test, se detectaron mediante hibridación como cepas sensibles y resistentes a claritromicina. De las 11 cepas resistentes a claritromicina por E-test, 9 se confirmaron como resistentes a dicho antibiótico genotípicamente. 1 de las 11 cepas resistentes no mostró ninguna mutación en este método de biología molecular estudiado y otra cepa presentó mediante biología molecular hetero-resistencia. La mutación encontrada en todas las cepas con resistencia a claritromicina fue en la posición A2143G excepto en una cepa que fue en la posición A2142G. Todos estos datos vienen especificados en la siguiente tabla.

## Resultados

Tabla 4.2.1 a Comparación de los datos obtenidos mediante hibridación y el cultivo.

Número pacientes	<u>Cultivo de la biopsia</u>		<u>GenotType HelicoDR</u>			<u>Secuen- ciación</u>
	Cultivo	E-test	Resultado	Mutatdo	wild-type	
6	+	S	+		+	No mut
4	+	S	+		+	ND
5	+	R	+	+		A2143G
1	+	R	+	+		A2142G
3	+	R	+	+		ND
1	+	S	+	+		A2143G
1	+	S	+	+	+	A2143G
1	+	S	+	+	+	A2143G
1	+	R	+	+	+	ND
1	+	R	+		+	No mut

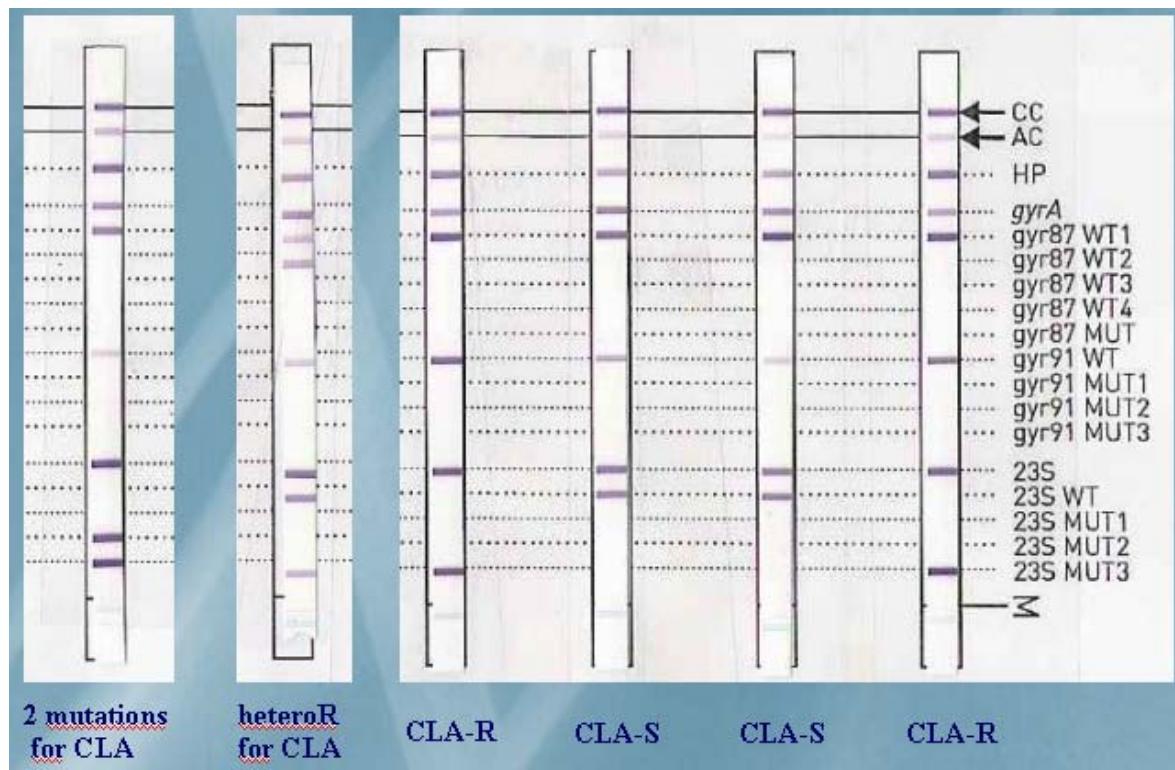
ND: secuencia no determinada.

Tabla 4.2.1 b Sensibilidad, especificidad y los valores predictivos para el “GenoType® HelicoDR” para detectar resistencia a claritromicina.

	<u>Detección de resistencia a claritromicina.</u>
<u>Especificidad (%)</u>	<b>91</b>
<u>Sensibilidad (%)</u>	<b>90</b>
<u>PPV (%)</u>	<b>90</b>
<u>NPV (%)</u>	<b>91</b>



Gráfica 4.2.1 Interpretación de las tiras de nitrocelulosa obtenidas mediante hibridación.



CC: Control de conjugado.

AC: Control de amplificación.

H.P: *Helicobacter pylori*.

gyrA: gen *gyrA* para detectar resistencia a quinolonas.

23S: para detectar resistencia a claritromicina.

### 4.3 ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* EN MADRID 2008.

#### 4.3.1 Datos de sensibilidad a claritromicina.

Nº orden	Nº de cepa	E-Test CLA ---	CMI (ml/l)	Mutación BM
1	186788	Sensible	0.047	Ninguna
2	187112	Sensible	0.023	Ninguna
3	187505	Resistente	12	A2143G
4	187507	Sensible	0.016	Ninguna
5	186792	Sensible	0.016	Ninguna
6	187510	Sensible	0.047	Ninguna
7	187509	Sensible	0.016	Ninguna
8	187508	Sensible	≤0.016	Ninguna
9	182001	Resistente	4	A2143G
10	180241	Resistente	3	A2143G
11	182090	Sensible	0.064	Ninguna
12	182301	Sensible	0.094	Ninguna
13	186589	Sensible	0.023	Ninguna
14	186695	Resistente	>256	A2142G
15	182439	Sensible	0.023	Ninguna
16	182302	No realizado	No realizado	A2143G
17	188283	Sensible	0.047	Ninguna
18	188285	Resistente	>256	A2143G
19	181862	Sensible	≤0.016	Ninguna
20	181663	Sensible	0.023	Ninguna
21	182089	Sensible	0.047	Ninguna
22	186795	Resistente	2.0	NINGUNA
23	186788	Sensible	0.047	Ninguna
24	184184	Resistente	1.0	A2143G
25	185921	Resistente	1.5	A2143G
26	180992	Resistente	48	NINGUNA
27	185919	Sensible	0.023	Ninguna
28	185922	Resistente	>256	A2143G
29	183532	Resistente	>256	A2143G
30	183335	Sensible	≤0.016	Ninguna
31	182881	Sensible	≤0.016	Ninguna
32	182879	Sensible	0.016	Ninguna
33	182878	Sensible	<0.016	Ninguna
34	182876	Resistente	4	A2143G
35	182764	Sensible	0.023	Ninguna
36	182005	Sensible	0.023	Ninguna
37	182167	Sensible	0.047	Ninguna
38	185918	Resistente	3.0	A2143G
39	185887	Resistente	4.0	A2143G/T2182C
40	185662	Sensible	≤0.016	Ninguna
41	183863	Resistente	2.0	A2143G

## Resultados

42	183989	Sensible	0.064	Ninguna
43	183865	Resistente	2.0	A2143G
44	183864	Resistente	>256	A2143G
45	183491	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
46	183990	Resistente	>256	NINGUNA
47	183869	Sensible	$< 0.016$	Ninguna
48	183868	Sensible	0.023	Ninguna
49	183867	Sensible	0.016	Ninguna
50	183866	Resistente	6.0	A2143G
51	193668	Sensible	0.016	Ninguna
52	188282	Sensible	0.023	Ninguna
53	198932	Sensible	0.25	Ninguna
54	172177	Sensible	0.19	Ninguna
55	172839	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
56	180532	Sensible	$< 0.016$	Ninguna
57	179515	Resistente	8.0	NINGUNA
58	181546	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
59	180531	Sensible	$< 0.016$	Ninguna
60	176465	Resistente	12.0	A2143G
61	185924	Sensible	0.047	Ninguna
62	181681	Resistente	12.0	A2143G
63	182164	Sensible	0.047	Ninguna
64	180354	Sensible	0.003	Ninguna
65	172810	Resistente	2.0	A2143G/T2182C
66	168867	Resistente	12.0	NINGUNA
67	180782	Resistente	1.0	A2143G
68	168884	Resistente	32	A2143G
69	172180	Resistente	1.0	T2182C
70	173200	Resistente	32	A2143G
71	171462	Sensible	0.047	Ninguna
72	191483	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
73	171461	Resistente	2.0	NINGUNA
74	177299	Sensible	0.016	Ninguna
75	174720	Sensible	0.064	Ninguna
76	180533	Sensible	0.023	Ninguna
77	178742	Resistente	24.0	A2142G
78	180901	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
79	191828	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
80	177465	Resistente	12.0	A2143G
81	180349	Resistente	24.0	A2143G
82	181317	Sensible	$\leq 0.016$	Ninguna
83	180063	Resistente	32	A2143G
84	178744	Sensible	0.064	Ninguna
85	189720	Sensible	0.023	Ninguna
86	189999	Resistente	4.0	A2143G
87	189719	Sensible	0.016	Ninguna
88	189205	Sensible	0.016	Ninguna
89	180352	Resistente	32	A2142G
90	190657	Sensible	0.016	Ninguna
91	180901	Sensible	$< 0.016$	Ninguna

## Resultados

92	180659	Sensible	<0.016	Ninguna
93	171462	Sensible	0.047	Ninguna
94	171463	Sensible	0.016	Ninguna
95	189204	Sensible	<0.016	Ninguna
96	191033	Resistente	32	NINGUNA
97	181316	Sensible	<0,016	Ninguna
98	181546	Sensible	<0,016	Ninguna
99	189998	Sensible	<0,016	Ninguna
100	190800	Sensible	0,023	Ninguna
101	190810	Sensible	0,016	Ninguna
102	190804	Sensible	0,032	Ninguna
103	190806	Resistente	12	NINGUNA
104	200836	Sensible	<0,016	Ninguna
105	204137	Resistente	3	A2143G
106	190471	Sensible	0,016	Ninguna
107	200355	Sensible	<0,016	Ninguna
108	165725	Resistente	32	A2143G
109	201388	Sensible	<0,016	Ninguna
110	191830	Sensible	0,032	Ninguna
111	201387	Sensible	0,023	Ninguna
112	166461	Resistente	2	A2143G/T2182C
113	165034	Resistente	1,5	A2143G
114	202810	Sensible	0,023	Ninguna
115	200351	Sensible	<0,016	Ninguna
116	190000	Resistente	12	T2182C
117	189629	Sensible	<0,016	Ninguna
118	200837	Sensible	<0,016	Ninguna

Cla: claritromicina

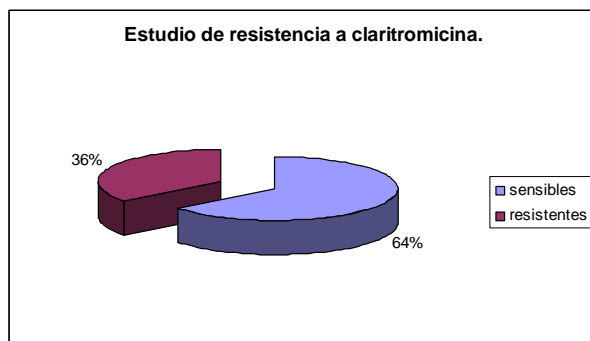
BM: biología molecular

CMI: concentración mínima inhibitoria

#### 4.3.2 Sensibilidad a claritromicina.

Se estudió la sensibilidad a claritromicina en un total de 117 aislamientos por E-test. De los que 75 (64%) resultaron sensibles y 42 (36%) resultaron resistentes por dicho método.

Gráfica 4.3.2 Porcentaje de resistencia a claritromicina por E-test.



Se compararon los resultados de sensibilidad a claritromicina obtenidos por E-test, con los obtenidos mediante secuenciación. Se encontró correlación entre ambos métodos en el 80.9% de los casos.

De los 118 aislamientos estudiados, 75 (63.5%) fueron sensibles a claritromicina por ambos métodos y 34 (28.8%) resultaron resistentes a claritromicina por E-test y por biología molecular. Se encontraron discrepancias en 8 casos, los cuales fueron resistentes por E-test, pero no se encontró ninguna mutación conocida en la secuencia estudiada del 23S RNAr, estas cepas se les ha denominado indeterminadas.

Una cepa fue excluida del estudio por no tener resultado acerca de su sensibilidad a claritromicina por E-test. Sólo se pudo estudiar mediante biología molecular.

Tabla 4.3.2 Datos de sensibilidad a claritromicina mediante E- test y secuenciación.

<b><u>SENSIBILIDAD A CLARITROMICINA</u></b>	<b><u>N</u></b>	<b><u>%</u></b>
<b>Sensible (por E-test y secuenciación)</b>	75	63.5
<b>Resistente (por E-test y secuenciación)</b>	34	28.8
<b>Indeterminadas (por E-test y secuenciación)</b>	8	6.8

#### 4.3.2.1 Detección de la mutación responsable de la resistencia a claritromicina.

La mutación en la posición 2058 ó 2059 de *E. coli* correspondiente a 2142 y 2143 en *H. pylori* que consiste en un cambio de adenina por guanina. Además también se estudió la presencia de mutación en posición 2182 que consiste en un cambio de timina por citosina.

Figura 4.3.2.1 Secuencia de bases para el estudio de resistencia a claritromicina.

CLA118 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA33 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA83 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA91 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	A2142G
CLA68 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	T2182C
CLA114 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA69 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA88 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	
CLA29 :	CACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	A2143G
CLA51 :	TACCCGCGGC-AAGACGGGAGAGACCCCGTGGACCTTTACTACAACCTTAGCACTGCTAATGGGAATATCA	

La mutación en la posición 2143 es la más frecuente encontrada en 85.4% de nuestras cepas resistentes. Las mutaciones en las posiciones 2142 y 2182 fueron encontradas cada una en el 14.7%.

Tabla 4.3.2.1 Mutaciones que producen resistencia.

<b>MUTACIÓN</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
A 2142 G	2	5.8
A 2143 G	26	76.6
T 2182 C	2	5.8
A 2143 G + T 2182 C	3	8.8
A 2142 G + T 2182 C	1	2.9

#### 4.3.2.2 Secuenciación de 695 pares de bases de la región 23S RNAr para detectar resistencia a claritromicina en las cepas que hubo discrepancia entre el método fenotípico y el genotípico.

Se amplificó una secuencia de 695 pares de bases del gen 23S RNAr, entre las posiciones 2061 y 2756, para poder buscar otras posibles mutaciones en aquellas cepas que se encontró discrepancia entre ambos métodos.

Las mutaciones buscadas son las siguientes que previamente han sido publicadas en la literatura por distintos autores:

- A2115G
- G2141A
- C2147G

- T2190C
- C2195T
- A2223G
- C2694A

Y en ninguna de las secuencias, de las ocho cepas discrepantes, se encontró ninguna de estas mutaciones.

#### **4.3.2.3 RFLP (restriction fragment length polymorphism technique)**

La mutación en la posición 2143 de *H. pylori*, cambio de adenina por guanina, es la más frecuente que confiere resistencia a claritromicina en nuestro medio. La digestión del producto amplificado del 23S rRNA con la enzima *BsaI*, permite discriminar de manera rápida esta mutación.

Los resultados de la digestión con la enzima *BsaI*, dan lugar a un fragmento de 304 y otro de 101 pares de bases.



Figura 4.3.2.3 Estudio de la resistencia a claritromicina:

Digestión con la enzima *BsaI*.

Pocillos 1 y 2: fragmentos no digeridos por la enzima.

Pocillos 2 y 4: fragmentos digeridos por la enzima.

Pocillo 1: marcador.

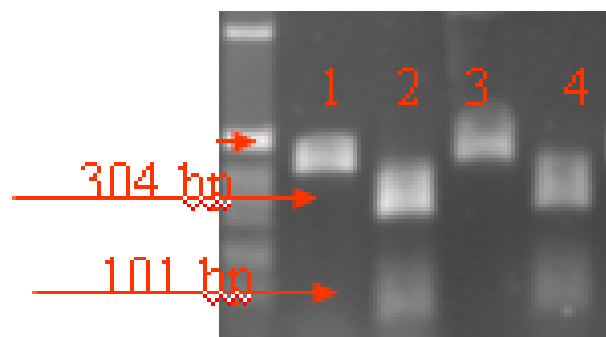


Tabla 4.3.2.3 Características de las cepas resistentes a claritromicina estudiadas mediante RFLP.

<u><b>Mutación</b></u>	<u><b>N</b></u>	<u><b>RPFL-PCR</b></u>
A2142G	2	NEGATIVAS
A2143G	26	POSITIVAS
A2143G + T2182C	3	POSITIVAS
NO MUTACIÓN	10	NEGATIVAS

Todas las cepas que tenían la mutación en la posición A2143G fueron digeridas por la enzima.

#### 4.3.2.4 Relación de la resistencia a claritromicina con factores del paciente.

##### 4.3.2.4.1 Relación entre la edad y la sensibilidad a claritromicina.

Se observó que los niños estaban colonizados con cepas más resistentes a claritromicina que los pacientes adultos, esta diferencia fue estadísticamente significativa como se puede ver en la siguiente tabla. (OR: 3.60  $p < 0.003$  by  $\chi^2$  análisis)

Tabla 4.3.2.4.1 Relación entre la edad y la sensibilidad a claritromicina.

	<b>N</b>	<b>Niños (n= 61)</b>		<b>Adultos (n= 57)</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Sensibles</b>	75	30	49.2	45	78.9
<b>Resistentes</b>	34	24	39.3	10	17.5
<b>Indeterminadas</b>	9	7	11.5	2	3.5

##### 4.3.2.4.2 Relación entre el lugar de nacimiento y la sensibilidad a claritromicina.

En los pacientes que nacieron fuera de España se aislaron cepas menos resistentes a claritromicina, que las aisladas en pacientes nacidos en España, esta diferencia fue estadísticamente significativa (OR: 0.32  $p < 0.0047$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.2.4.2 Relación entre el lugar de nacimiento y sensibilidad a claritromicina.

	<b>N</b>	<b>Espanoles (n=90)</b>		<b>No Espanoles (n=28)</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Sensibles</b>	75	53	58.9	22	78.6
<b>Resistentes</b>	34	30	33.3	4	14.3
<b>Indeterminadas</b>	9	7	7.8	2	7.1

#### 4.3.2.4.3 Relación entre el tratamiento previo frente a *H. pylori* y la sensibilidad a claritromicina.

Se estudió la relación entre la resistencia a claritromicina y los pacientes que habían tenido un tratamiento previo específico frente a *H. pylori*. 24 (20.3%) de nuestros pacientes habían tenido tratamiento, y de estos pacientes el 58.3% estuvieron infectados por cepas resistentes a claritromicina, frente al 21.3% de los pacientes que no habían recibido ningún tratamiento. Esta diferencia fue estadísticamente significativa. (OR: 5.86  $p < 0.0023$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.2.4.3 Relación entre el tratamiento previo frente a *H. pylori* y la sensibilidad a claritromicina.

	<b>N</b>	<b>Tratamiento previo (n= 24)</b>		<b>Sin tratamiento previo (n= 94)</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sensibles</b>	75	8	33.3	67	71.3
<b>Resistentes</b>	34	14	58.3	20	21.3
<b>Indeterminadas</b>	9	2	8.3	7	7.4

#### 4.3.2.4.4 Relación entre el género y la sensibilidad a claritromicina.

No se observó ninguna relación estadísticamente significativa entre el género (hombre o mujer) y la sensibilidad a claritromicina. (OR: 1.95  $p < 3.56$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.2.4.4 Relación entre el género y la sensibilidad a claritromicina.

	<b><u>N</u></b>	<b><u>Mujer (n= 78)</u></b>		<b><u>Hombre (n= 40)</u></b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Sensibles</b>	75	49	62.8	26	65.0
<b>Resistentes</b>	34	24	30.8	10	25.0
<b>Indeterminadas</b>	9	5	6.4	4	10.0

## 4.3.3 Datos globales de la detección de genes asociados a la virulencia.

N	Cepa	Edad	Género	Origen	Tto	vacAm	vacAs	vacAi	cagA	ins180bp
1	186788	Adulto	Mujer	España	PPI	m 2	s 2	i2	Negativo	430
2	187112	Adulto	Hombre	España	NO	m 2	s 2	i2	Negativo	610
3	187505	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	i2	Negativo	610
4	187507	Niño	Hombre	España	NO	m 1	s 1	i1	Positivo	430
5	186792	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	i2	Negativo	430
6	187510	Niño	Hombre	Gitano	SI	m 1	s 1	i1	Positivo	430
7	187509	Niño	Mujer	S. América	NO	m 1	s 1	i1	Positivo	430
8	187508	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	i2	Negativo	430
9	182001	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
10	180241	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
11	182090	Niño	Mujer	India	NO	m1 m2	s 1	-	Positivo	430
12	182301	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
13	186589	Adulto	Hombre	España	NO	m 1	s 1	i1	Positivo	430
14	186695	Niño	Mujer	España	SI	m 2	s 1	i1	Positivo	430
15	182439	Adulto	Hombre	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
16	182302	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
17	188283	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
18	188285	Adulto	Hombre	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
19	181862	Adulto	Mujer	España	NO	m 1	s 1	i1	Positivo	430
20	181663	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 2	s 2	i1	Positivo	430
21	182089	Adulto	Mujer	S. América	PPI	m 1	s 1	-	Positivo	430
22	186795	Niño	Mujer	S. América	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
23	186788	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
24	184184	Niño	Mujer	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	610
25	185921	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
26	180992	Niño	Mujer	España	NO	m1 m2	s 1	-	Positivo	610
27	185919	Adulto	Mujer	Italia	NO	m 1	s 1	-	Positivo	610
28	185922	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
29	183532	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
30	183335	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
31	182881	Adulto	Mujer	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
32	182879	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	i1	Positivo	430
33	182878	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
34	182876	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
35	182764	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
36	182005	Adulto	Hombre	Rusia	NO	m 1	s 2	i1	Positivo	430
37	182167	Adulto	Mujer	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	610
38	185918	Adulto	Mujer	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
39	185887	Adulto	Mujer	España	OCA	m 2	s 2	-	Negativo	430
40	185662	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	i1	Positivo	610
41	183863	Niño	Hombre	Etiopía	OCA	m 2	s 2	-	Negativo	430
42	183989	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
43	183865	Niño	Hombre	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
44	183864	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
45	183491	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430

## Resultados

46	183990	Niño	Hombre	España	OCA	m 2	s 2	-	Negativo	430
47	183869	Niño	Mujer	Gitano	SI	m 2	s 1	l1	Positivo	610
48	183868	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
49	183867	Niño	Hombre	S. América	NO	m 1	s 1	-	Positivo	610
50	183866	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
51	184184	Niño	Hombre	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
52	188282	Adulto	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
53	181862	Adulto	Mujer	España	NO	m 1	s 1	-	Bordes	430
54	172177	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
55	172839	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
56	180532	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 1	s 1	-	Positivo	610
57	179515	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
58	181546	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
59	180531	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	610
60	176465	Adulto	Mujer	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
61	185924	Niño	Mujer	S. América	NO	m 1	s 1	-	Positivo	610
62	181681	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
63	182164	Adulto	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
64	180354	Adulto	Hombre	España	NO	m 2	s 1	l2	Positivo	430
65	172810	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Negativo	430
66	168867	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
67	180782	Adulto	Mujer	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
68	168884	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
69	172180	Niño	Mujer	S. América	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
70	173200	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
71	171462	Niño	Mujer	Rumania	NO	m 1	s 1	-	Bordes	430
72	191483	Adulto	Hombre	Rumania	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
73	171461	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	610
74	177299	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	l1	Positivo	430
75	174720	Niño	Hombre	China	NO	m1 m2	s 2	-	Positivo	430
76	180533	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
77	178742	Niño	Hombre	Marruecos	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
78	180901	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
79	191828	Adulto	Hombre	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
80	177465	Niño	Mujer	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
81	180349	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
82	181317	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
83	180063	Niño	Hombre	España	SI	m 2	s 2	-	Negativo	430
84	178744	Niño	Hombre	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
85	189720	Adulto	Hombre	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
86	189999	Adulto	Mujer	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
87	189719	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
88	189205	Adulto	Hombre	España	NO	m 1	s 2	l2	Negativo	610
89	180352	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	610
90	190657	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
91	180901	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
92	180659	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	l1	Positivo	430
93	171462	Niño	Mujer	Rumania	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
94	171463	Niño	Hombre	Rumania	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
95	189204	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430

## Resultados

96	191033	Adulto	Mujer	España	PPI	m 1	s 1	-	Positivo	430
97	181316	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
98	181546	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
99	189998	Adulto	Hombre	España	PPI	m 2	s 2	-	Negativo	430
100	190800	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
101	190810	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
102	190804	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
103	190806	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
104	200836	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
105	204137	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
106	190471	Niño	Mujer	S. América	SI	m 1	s 2	l1	Positivo	610
107	200355	Niño	Hombre	España	NO	m 1	s 1	-	Positivo	430
108	165725	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
109	201388	Niño	Mujer	España	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
110	191830	Adulto	Mujer	Rumania	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
111	201387	Niño	Hombre	S. América	NO	m1 m2	s 2	-	Negativo	430
112	166461	Niño	Mujer	Rumania	NO	m 2	s 1	l1	Positivo	430
113	165034	Adulto	Mujer	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
114	202810	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
115	200351	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
116	190000	Adulto	Mujer	España	PPI	m 1	s 2	l1	Positivo	610
117	189629	Adulto	Mujer	S. América	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430
118	200837	Niño	Hombre	España	NO	m 2	s 2	-	Negativo	430

Tto: tratamiento.

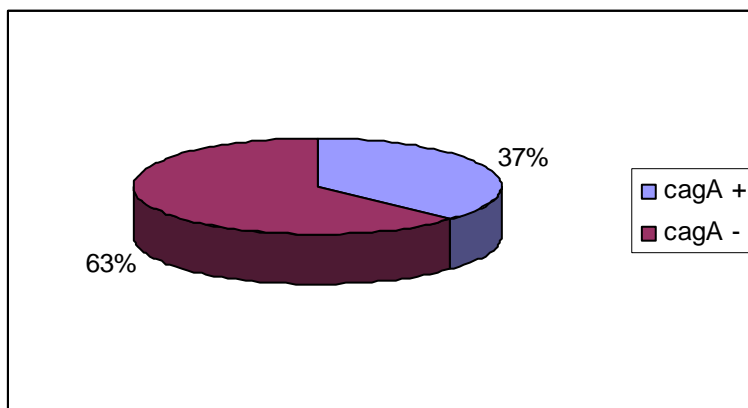
PPI: inhibidor de la bomba de protones.

-: no determinada.

#### 4.3.3.1 Detección del gen *cagA*.

Se estudió la presencia del *cagA* en un total de 118 cepas, aisladas en Madrid en el año 2008, de las cuales 44 (37%) eran positivas para este gen y 74 (63%) eran negativas.

Tabla 4.3.3.1 Porcentajes globales de *cagA*+ y *cagA*- cepas.



De las 74 cepas que fueron *cagA* negativas, 72 (97%) se confirmaron que eran realmente negativas para este gen por una PCR específica que amplificaba la región del “empty-site”. En las 2 cepas restantes que resultaron negativas para el “empty-site” se confirmaron que tenían parcialmente la “isla de patogenicidad *cagA*”, porque fueron positivas para la región derecha y la izquierda de esta “isla”.



Figura 4.3.3.1 a- Detección del gen *cagA*.

El tamaño depende del número de fosforilaciones EPIYA repetitivas.

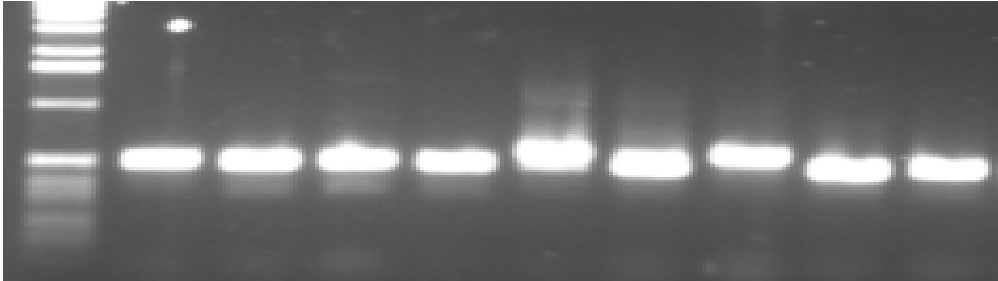
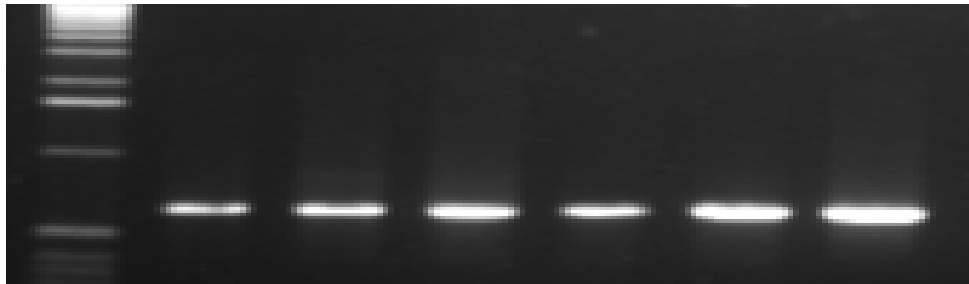


Figura 4.3.3.1 b- Detección del “empty-site”

560 pares de bases



#### 4.3.3.1.1 Detección del número y tipos de fosforilación EPIYA repetitiva en el extremo carboxilo terminal de la proteína CagA.

Los productos amplificados del gen *cagA* fueron enviados a secuenciar. El extremo carboxilo terminal se caracteriza por la presencia de una secuencia única de aminoácidos Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) y se han identificado cuatro segmentos diferentes en función de las secuencias que tienen a su alrededor, que se denominan secuencia A, B, C y D.

Figura 4.3.3.1.1 Secuenciación del producto amplificado del gen *cagA* para ver el número y tipo de fosforilación EPIYA repetitiva.



```

Mad71 : -NGTLVGNGLSKTEATTLTKNFSDIRKELSEKLFNGSNNNNN-GLKNNTPEPIYAKVKKKTGOVASPEE-
Mad114 : --GTLVGNGLSKTEATTLTKNFSDIRKELSEKLFNGSNNNNN-GLKNNTPEPIYAKVKKKTGOVASPEE-
4Mad : --GTLVGNGLSQAEATTLTKNFSDIKKELNAKLFNGSNNNNNNGLKNSTPEPIYAKVKKKTGOVASPEE-
Mad36 : -----GNGLSKAEATTLTKNFSDIKKELNAKL-GNLNNNNN-GFKN-----GKDKGPEE-
Mad50 : VNGTLVGNGLSQAEATTLTKNFSDIKKELNAKLFNGSNNNNNNGLKN--EPIYAKVKKKTGOVASPEE-
Mad37 : --GTLVGNGLSQAEATTLTKNFSDIKKELNAKLFNGSNNNNNNGLKN--EPIYAKVKKKTGOVASPEE-

Mad71 : ---PIYAKVKKVSAKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAG---
Mad114 : ---PIYAKVKKVSAKIDQLNEATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAG---
4Mad : ---PIYAKVKKVTQKIDQLNQAASGFGGVGQA-GFPLKRHDKVDDLSKVG---
Mad36 : ---PIYAKVKKVAKIDQLNQAASGFGGVGQA-GFLLKRHDKVDDLSKVG---
Mad50 : ---PIYAKVKKVNAKIDQLNQAASGFGGVGQA-GFPLKRHDKVDDLSKVG---
Mad37 : ---PIYAKVKKVNAKIDQLNQAASGLGGVGQA-VGFPLKRHDKVDDLSKVG---

Mad71 : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----
Mad114 : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----
4Mad : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----
Mad36 : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----
Mad50 : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----
Mad37 : -----EPIYAKVKKKTGOVASPEE-----

```

De las 44 cepas *cagA* positivas, 25 (56.8%) tenían 3 sitios EPIYA siendo estos A, B y C.

Tabla 4.3.3.1.1 a- Número y tipos de motivos de fosforilación EPIYA.

Cantidad de motivos de fosforilación EPIYA	Tipos de motivos de fosforilación EPIYA	Cepas (n=44)	
		n	%
<b><u>Cepas únicas</u></b>			
1	A	1	2.2
2	BC	1	2.2
3	ABC	25	56.8
3	ABD	2	4.4
4	ABCC	9	20.4
4	AABC	1	2.2
6	ABBBCC	2	4.4
<b><u>Cepas mixtas para el gen <i>vacA</i></u></b>			
3	ABC	3	6.8

El 37.4 % de las cepas procedentes de adultos poseían más de tres sitios EPIYA en la secuencia del producto amplificado del gen *cagA*. Los aislamientos procedentes de niños sólo un 15% tuvieron más de tres sitios EPIYA en su secuencia. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (OR 3.38  $p < 0.0003$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.3.1.1 b- Número y tipos de motivos de fosforilación EPIYA según la edad.

Cantidad de motivos de fosforilación EPIYA	Tipos de motivos de fosforilación EPIYA	Adultos (n=24)		Niños (n=20)	
		n	%	N	%
<b><u>Cepa única</u></b>					
1	A	0	0	1	5
2	BC	1	4.1	0	0
3	ABC	14	58.3	11	55
3	ABD	0	0	2	10
4	ABCC	6	25	3	15
4	AABC	1	4.1	0	0
6	ABBBCC	2	8.3	0	0
<b><u>Cepas mixtas</u></b>					
3	ABC	0	0	3	15

## Resultados

La mayoría de las cepas procedentes de pacientes nacidos en España poseían los segmentos EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C en la secuencia del gen *cagA*. De los pacientes nacidos fuera de España el 53% tenían una secuencia del gen *cagA* distinta a ésta. Esta diferencia fué estadísticamente significativa (OR 2.35  $p < 0.002$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.3.1.1 c- Tabla de número y tipos de motivos de fosforilación EPIYA según el lugar de nacimiento.

Cantidad de motivos de fosforilación EPIYA	Tipos de motivos de fosforilación EPIYA	Pacientes nacidos en España (n=25)		Pacientes nacidos fuera de España (n=19)	
		n	%	n	%
<b>Cepas únicas</b>					
1	A	1	4	0	0
2	BC	0	0	1	5.2
3	ABC	16	64	9	47.4
3	ABD	0	0	2	10.5
4	ABCC	5	20	4	21.1
4	AABC	1	4	0	0
6	ABBBCC	1	4	1	5.3
<b>Cepas mixtas</b>					
3	ABC	1	4	2	10.5

### 4.3.3.2 Detección de los alelos del gen *vacA*.

#### 4.3.3.2.1 Detección de la región *m* y *s*.

Se estudió en un total de 118 aislamientos la presencia de los alelos *s1* o *s2* y *m1* o *m2* del gen *vacA*. En todos los aislamientos se detectó uno de los dos alelos. De las 118 cepas en 72 (61%) se detectó la presencia de la combinación del gen *vacA s2m2*.

Gráfico 4.3.3.2.1 Distribución de los alelos del gen *vacA*.



Figura 4.3.3.2.1 a- Detección del alelo *m1* o *m2*.

Pocillos 6, 10, 13, fragmentos del alelo *m1* (290 pares de bases).

Pocillos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12, fragmentos del alelo *m2* (350 pb).

Pocillo 1, marcador de peso molecular.

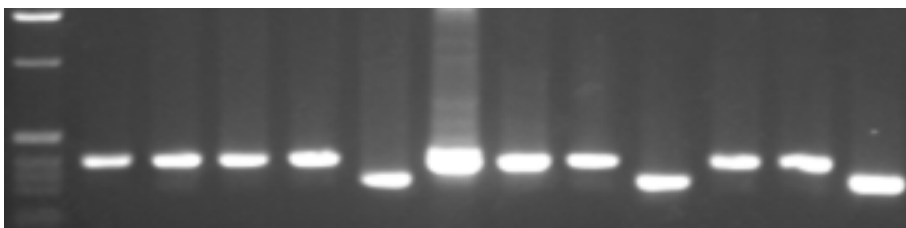
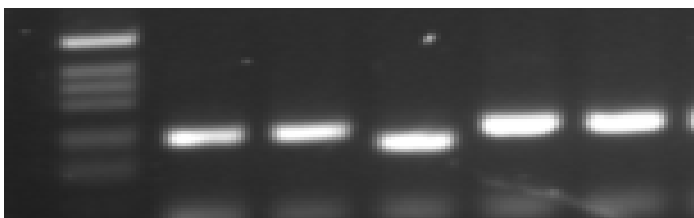


Figura 4.3.3.2.1 b- Detección del alelo *s1* o *s2*.

Pocillos 4, fragmentos del alelo *s1* (176 pb).

Pocillos 2, 3, 5, 6, fragmentos del alelo *s2* (200 pb).

Pocillo 1, marcador de peso molecular



#### 4.3.3.2.2 Relación entre los alelos del gen *vacA* y el lugar de nacimiento del paciente.

Se estudió la relación entre el gen *vacA* y el origen del paciente. El 71% de los pacientes nacidos en España tuvieron una combinación de alelos del gen *vacA* *s2m2*. Esta proporción fue mucho mayor si se compara con los pacientes nacidos fuera de España, en los que sólo un 28.6% tuvieron dicha combinación. Esta diferencia fue estadísticamente significativa (OR: 6.43  $p < 0.000$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.3.2.2 Relación del gen *vacA* y el lugar de nacimiento.

	<b>Total</b>		<b>Inmigrantes (n=28)</b>		<b>Espanoles (n=90)</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>s1m1</i>	22	19.3	11	39.3	11	12.2
<i>s1m2</i>	16	14.1	4	14.3	12	13.3
<i>s2m1</i>	4	3.5	2	7.1	2	2.0
<i>s2m2</i>	72	63.2	8	28.6	64	71.1
<b>Cepas mixtas:</b>	4	3.5	3	10.7	1	1.1
<i>m1m2s1</i>	2		1		1	
<i>m1m2s2</i>	2		2			

#### 4.3.3.2.3 Relación entre los alelos del gen *vacA* y la edad del paciente.

Se estudió la relación entre las diferentes combinaciones alélicas del gen *vacA* y la edad de los pacientes, como se puede observar en la siguiente tabla.

No se encontró ninguna diferencia entre la edad adulta y la niñez en relación a las diferentes combinaciones alélicas (OR: 0.78  $p < 0.38$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.3.2.3 Relación del gen *vacA* y la edad del paciente.

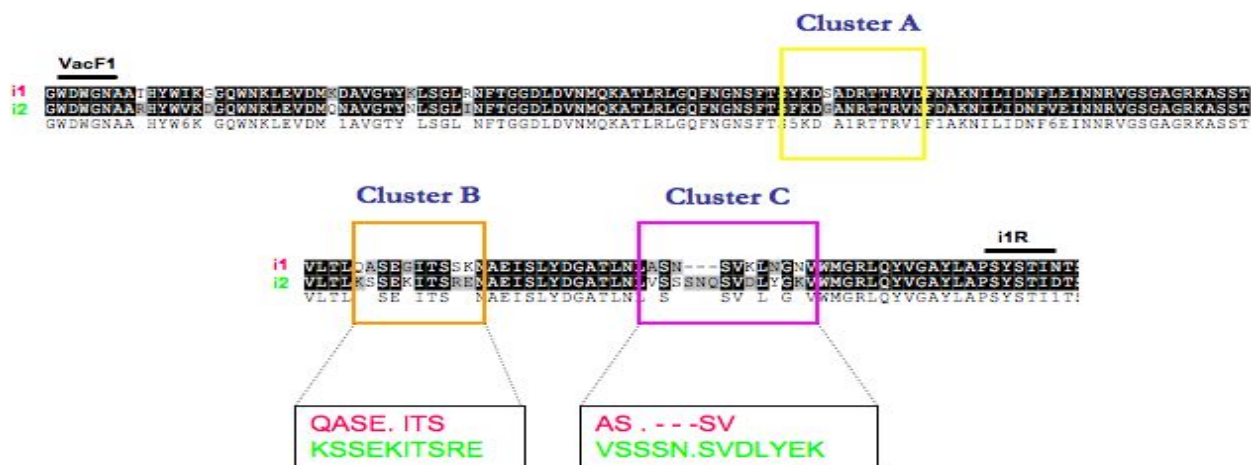
	<b>Total</b>		<b>Adultos (n=57)</b>		<b>Niños (n=61)</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>s1m1</i>	22	19.3	12	21	10	16.4
<i>s1m2</i>	16	14.0	9	15.8	7	11.5
<i>s2m1</i>	4	3.5	3	5.2	1	1.6
<i>s2m2</i>	72	63.2	33	57.9	39	63.9
<b>Cepas mixtas:</b>	4	3.5			4	6.6
<i>m1m2s1</i>	2					
<i>m1m2s2</i>	2					

#### 4.3.3.2.4 Detección de la región intermedia del gen *vacA*.

El criterio para determinar la región intermedia (*i1* o *i2*) es la secuenciación del producto amplificado en base a las secuencias de aminoácidos de los “cluster B” y “cluster C”.



Figura 4.3.3.2.4 Secuenciación del producto amplificado de la región intermedia del *gen vacA*.



Se estudió la relación de la región intermedia del *gen vacA* en las cepas que habían tenido la combinación alélica *s1m2*. De las 16 cepas que tenían esta combinación alélica 15 (93.7%) tenían la región intermedia *i1*.

Tabla 4.3.3.2.4 Relación de las los alelos *s* y *m* de la región *vacA* con la región intermedia del *gen vacA*.

	<u>N</u>	<i>i1</i> :CLUSTER B QASE.ITS	<i>i2</i> : CLUSTER B KSSEKITSRE	<i>i1</i> : CLUSTER C AS.----SV	<i>i2</i> : CLUSTER C VSSN.SV D
<i>s1m2</i>	16	15	1	15	1
<i>s2m1</i>	4	3	1	3	1
<i>s2m2 cagA+</i>	3	3	0	3	0
<i>s2m2</i>	5	0	5	0	5
<i>s1m1</i>	5	5	0	5	0

#### 4.3.3.3 Relación entre el gen *cagA* y *vacA*.

Se estudió en un total de 118 cepas la relación entre la presencia o ausencia del gen *cagA* con la presencia de un determinado alelo *s1* o *s2* y *m1* o *m2*.

Del total de las cepas estudiadas, en 74 (62.7%) no se detectó la presencia del gen *cagA*.

En 69 (93.24%) de estas cepas *cagA* negativas se detectó la combinación de alelos *s2m2*.

Sí se comparan estos porcentajes, con cepas *cagA* positivas pero con una combinación alélica distinta a *s2m2*, obtenemos una diferencia estadísticamente significativa (OR: 188.60  $p < 0.000$  por  $\chi^2$  análisis).

Tabla 4.3.3.3 Relación entre el gen *cagA* y *vacA*.

	<b>N</b>	<b>%<i>cagA</i> + (n=44)</b>		<b>%<i>cagA</i> - (74)</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<i>s1m1</i>	22	20	45.5	2	2.7
<i>s1m2</i>	16	15	34.1	1	1.3
<i>s2m1</i>	4	3	6.8	1	1.3
<i>s2m2</i>	72	3	6.8	69	93.24
Cepas mixtas	4	3	6.8	1	1.3

#### 4.3.3.4 Relación entre los genes *cagA* y *vacA* y la resistencia a claritromicina.

Se intentó relacionar la presencia del gen *cagA* y de los alelos del gen *vacA* con la resistencia a claritromicina. Los resultados se exponen en las tablas adjuntas.

Tabla 4.3.3.4 a- Relación entre el gen *vacA* y la resistencia a claritromicina.

<b>Claritromicina</b>	<b>n</b>	<b>%<i>vacA</i> <i>s2m2</i></b>	<b>%<i>vacA</i> (diferente <i>s2m2</i>)</b>
<b>Sensible</b>	75	50.7	49.3
<b>Resistente</b>	34	82.3	17.7
<b>Indeterminadas</b>	9	75.0	25.0

Tabla 4.3.3.4 b- Relación entre el gen *cagA* y la resistencia a claritromicina.

Claritromicina	N	% <i>cagA</i> +
Sensible	75	48.0
Resistente	34	14.7
Indeterminadas	9	33.3

Las cepas más resistentes a claritromicina fueron más frecuentemente *cagA* negativas (14.7%) que las sensibles a claritromicina. Si se relaciona las resistencias con los alelos *s* y *m*, las cepas con la combinación alélica *s2m2* (82.3%) resultaron más resistentes a claritromicina que las cepas con una combinación distinta a esta (17.6%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (OR: 4.54  $p < 0.001$  por  $\chi^2$  análisis).

#### 4.3.4 Estudio de la presencia de genes informativos con la procedencia geográfica de las cepas de *Helicobacter pylori*.

##### 4.3.4.1 Detección de la presencia *ins180* bp.

Se estudió en un total de 118 cepas la presencia de la inserción de 180 pares de bases. Esta inserción podía dar información del origen africano de las cepas. Se detectó en 24 (20.3%) de las cepas. No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la presencia de la inserción 180 pares de bases y el origen del paciente, como se puede ver en la tabla adjunta.

Tabla 4.3.4.1 Relación de la *ins180* bp y el origen del paciente.

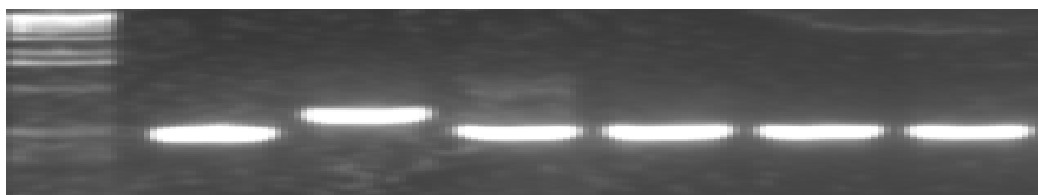
	<u>N</u>	<u><i>Ins 180 pb</i></u>		<u>No <i>ins 180 pb</i></u>	
		<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Espanoles	90	16	66.7	74	78.7
No españoles	28	8	33.3	20	21.3

Figura 4.3.4.1 Detección de la inserción de 180 pares de bases.

Pocillos 2, 4, 5, 6, 7, fragmentos sin *ins180* bp, 430 pares de bases.

Pocillo 3, fragmento de *ins180* bp 610 pares de bases.

Pocillo 1, marcador de peso molecular



### 4.3.5 MLST (Multi Locus Sequence Typing).

Se estudió la secuencia de bases MLST en las cepas peculiares del grupo de 118 cepas aisladas en Madrid 2008. Los resultados se adjuntan en la siguiente tabla.

Tabla 4.3.5 MLST:

#### **Helicobacter pylori MLST batch profile query**

Isolate	atpA	efp	mutY	ppa	trpC	ureI	yphC	ST
isolate_m1s2	302	466	349	326	333	1645	1633	NEW
isolate_m1s2	304	251	1577	328	343	1646	1634	NEW
isolate_m1s2	306	254	149	332	348	1647	1635	NEW
isolate_m2s2cg	316	274	1578	355	350	155	1636	NEW
isolate_m2s2cg	321	289	1579	341	365	1648	1637	NEW
isolate_gitano	1288	293	000	344	1600	1649	1638	NEW
isolate_gitano	323	294	1580	344	1601	1650	1639	NEW
isolate_abbbcc	324	296	1581	345	1602	1651	1640	NEW
isolate_abd	325	301	1582	348	1603	1652	1641	NEW
isolate_abd	327	304	1583	365	1604	000	1642	NEW

NEW: nueva cepa, no registrada antes en la base del datos “MLST”

## 4.4 ESTUDIO DE AISLAMIENTOS DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* EN ESPAÑA 1994.

### 4.4.1 Datos de los pacientes.

N	Cepa	Origen	E-test CLA---	CMI	Mutación
1	26081174	Madrid	Sensible	0.016	Ninguna
2	21061219	Madrid	Sensible	0.064	Ninguna
3	585	Madrid	Sensible	0.016	Ninguna
4	1386	Madrid	Resistente	32	A2143G
5	153059	Madrid	Resistente	64	A2142G
6	1648	Madrid	Sensible	0.032	Ninguna
7	1376	Madrid	Resistente	16	A2143G
8	1374	Madrid	Sensible	0.032	Ninguna
9	154187	Madrid	No realizado	No realizado	Ninguna
10	1391	Madrid	Sensible	0.032	Ninguna
11	588	Madrid	Sensible	<0.008	Ninguna
12	1370	Madrid	Resistente	16	NINGUNA
13	1291	Madrid	Sensible	0.016	Ninguna
14	154188	Madrid	No realizado	No realizado	Ninguna
15	1274	Madrid	Sensible	0.032	Ninguna
16	26111204	Madrid	Sensible	0.032	Ninguna
17	1734	Madrid	Resistente	32	A2143G
18	148103	Madrid	Sensible	0.125	Ninguna
19	152514	Madrid	Resistente	8	A2143G
20	1472	Madrid	Resistente	32	A2143G
21	1547	Madrid	Sensible	0.008	Ninguna
22	152513	Madrid	Sensible	0.064	Ninguna
23	H146	Almería	Sensible	0.008	Ninguna
24	H150	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
25	H126	Almería	Sensible	0.064	Ninguna
26	HI114	Almería	No realizado	No realizado	Ninguna
27	H151	Almería	Sensible	0.016	Ninguna
28	H114	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
29	H161	Almería	Resistente	8	A2143G
30	H117	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
31	H149	Almería	Sensible	0.032	Ninguna
32	H135	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
33	H147	Almería	Sensible	0.032	Ninguna
34	H133	Almería	Sensible	0.064	Ninguna
35	H179	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
36	H118	Almería	Sensible	0.016	Ninguna
37	HI67	Almería	Resistente	8	A2143G
38	H136	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
39	H140	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
40	H134	Almería	Sensible	0.064	Ninguna

## Resultados

41	H160	Almería	Resistente	2	A2143G
42	H144	Almería	Sensible	<0.008	Ninguna
43	SA99	Avilés	Sensible	0.016	Ninguna
44	SA47	Avilés	Sensible	0.064	Ninguna
45	SA113	Avilés	Sensible	0.016	Ninguna
46	SA46	Avilés	Sensible	0.016	Ninguna
47	SA52	Avilés	Sensible	<0.008	Ninguna
48	SA78	Avilés	Sensible	0.064	Ninguna
49	IB7	Ibiza	Sensible	0.016	Ninguna
50	IB1	Ibiza	Sensible	<0.008	Ninguna
51	IB22	Ibiza	Sensible	0.016	Ninguna
52	IB23	Ibiza	Sensible	0.032	Ninguna
53	IB6	Ibiza	Sensible	<0.008	Ninguna
54	IB19	Ibiza	Sensible	0.032	Ninguna
55	IB78	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
56	IB54	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
57	IB34	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
58	IB25	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
59	IB3	Ibiza	Sensible	0.032	Ninguna
60	IB18	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
61	IB2	Ibiza	Sensible	0.032	Ninguna
62	IB79	Ibiza	Sensible	0.064	Ninguna
63	IB17	Ibiza	Sensible	0.016	Ninguna
64	IB10	Ibiza	Sensible	0.016	Ninguna

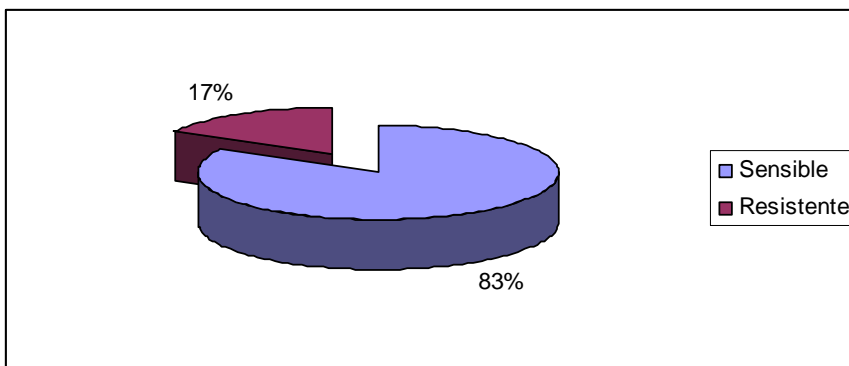
Cla: claritromicina

#### 4.4.2 Sensibilidad a claritromicina.

Se estudió la sensibilidad antimicrobiana para claritromicina en un total de 64 aislamientos de diferentes zonas de España.

De los 64 aislamientos, en 61 se tenían datos de sensibilidad a claritromicina por E-test. 51 (83%) resultaron sensibles a claritromicina y 10 (17%) resultaron resistentes a claritromicina por E-test.

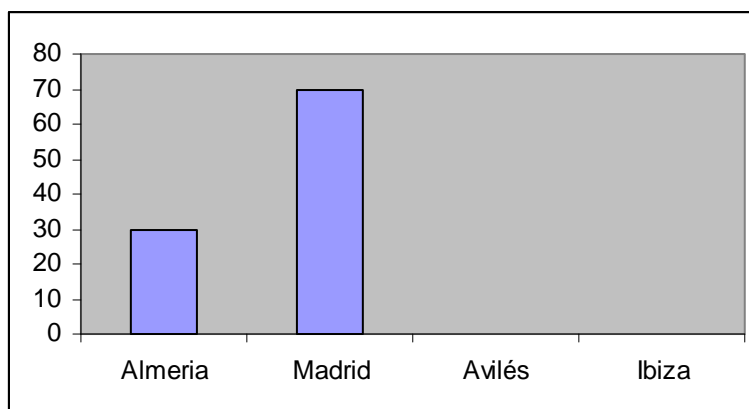
Gráfico 4.4.2 a- Porcentaje de resistencia a claritromicina por E-test.



Se estudiaron los datos de resistencia a claritromicina en las distintas regiones de España. Y se encontró que del 17% de resistencia a claritromicina encontrado en las cepas de España, el 70% pertenecían a cepas procedentes de Madrid, y el 30% de cepas procedentes de Almería. No encontrándose ninguna cepa resistente a claritromicina ni en Ibiza, ni en Avilés, como se puede ver en el gráfico adjunto.



Gráfico 4.4.2 b- Porcentaje de resistencia a claritromicina en las diferentes regiones de España por E-test.



Se compararon los resultados de sensibilidad a claritromicina obtenidos por E-test, con los obtenidos mediante secuenciación. Se observó correlación en un 90% de los casos.

De los 61 aislamientos estudiados por ambos métodos, 51 (83%) fueron sensibles a claritromicina y 9 (14%) resultaron resistentes a claritromicina por E-test y por biología molecular. Se encontró discrepancias en 1 caso, el cual fue resistente por E-test, pero no se encontró ninguna mutación conocida en la secuencia estudiada del 23S RNAr.

Tres cepas fueron excluidas del estudio por no tener resultado acerca de su sensibilidad a claritromicina por E-test. Sólo se pudo estudiar mediante biología molecular.

Tabla 4.4.2 Comparación de los resultados de resistencia claritromicina mediante E- test y secuenciación.

<b><u>SENSIBILIDAD A CLARITROMICINA</u></b>	<b><u>N</u></b>	<b><u>%</u></b>
<b>Sensible (por E-test y secuenciación)</b>	51	79.7
<b>Resistente (por E-test y secuenciación)</b>	9	14.1
<b>Indeterminadas (por E- test y secuenciación)</b>	4	62.5

#### 4.4.2.1 Detección de la mutación responsable de la resistencia a claritromicina.

En los 10 aislamientos que se encontró resistencia a claritromicina mediante secuenciación, la mutación encontrada en el 9 de los aislamientos fue un cambio de adenina por guanina en la posición 2143 y en la cepa restante se encontró un cambio de adenina por guanina en la posición 2142. No encontrándose en ninguno de los aislamientos mutación en la posición 2182.

## 4.4.3 Datos globales de la detección de genes asociados a la virulencia.

<b>N</b>	<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b><i>vacA m</i></b>	<b><i>vacAs</i></b>	<b><i>vacAi</i></b>	<b><i>cagA</i></b>	<b><i>Ins180bp</i></b>
1	26081174	Madrid	m2	s2	-		430
2	21061219	Madrid	m1	s2	-	pos	610
3	585	Madrid	m2	s2	-		430
4	1386	Madrid	m2	s2	-		430
5	153059	Madrid	m2	s2	-		430
6	1648	Madrid	m2	s2	-		430
7	1376	Madrid	m2	s2	-		430
8	1374	Madrid	m2	s1	/1	pos	430
9	154187	Madrid	m2	s2	-		430
10	1391	Madrid	m2	s2	-		610
11	588	Madrid	m2	s2	-		430
12	1370	Madrid	m1	s1	-	pos	610
13	1291	Madrid	m2	s2	-		430
14	154188	Madrid	m1	s1	-	pos	610
15	1274	Madrid	m2	s2	-		430
16	26111204	Madrid	m2	s2	-		430
17	1734	Madrid	m2	s2	-		430
18	148103	Madrid	m1	s1	-	pos	430
19	152514	Madrid	m2	s2	-		430
20	1472	Madrid	m2	s2	-		430
21	1547	Madrid	m1	s1	-	pos	430
22	152513	Madrid	m2	s2	-		430
23	H146	Almería	m2	s2	-		430
24	H150	Almería	m2	s1	/1	pos	430
25	H126	Almería	m1	s1	-	pos	430
26	H1114	Almería	m1	s1	-	pos	610
27	H151	Almería	m2	s1	/1	pos	430
28	H114	Almería	m2	s2	-		430
29	H161	Almería	m2	s1	/1	pos	430
30	H117	Almería	m2	s1	/1	pos	430
31	H149	Almería	m2	s1	/1	pos	430
32	H135	Almería	m1	s1	-	pos	430
33	H147	Almería	m2	s1	/1	pos	430
34	H133	Almería	m2	s1	/1	pos	430
35	H179	Almería	m2	s2	-		430
36	H118	Almería	m2	s2	-		430
37	H167	Almería	m1 m2	s2	-	pos	430
38	H136	Almería	m2	s1	/1	pos	430
39	H140	Almería	m2	s1	/1	ind	610
40	H134	Almería	m1	s1	-	pos	430
41	H160	Almería	m1	s1	-	pos	430
42	H144	Almería	m2	s2	-		430
43	SA99	Avilés	m2	s1	/1	pos	610
44	SA47	Avilés	m2	s2	-	ind	430
45	SA113	Avilés	m2	s2	-		430
46	SA46	Avilés	m1	s1	-	pos	430

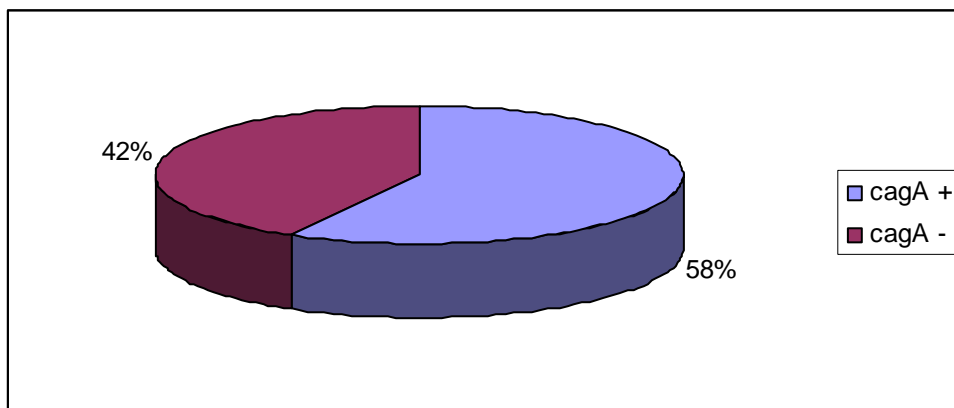
## Resultados

47	SA52	Avilés	m2	s2	-		430
48	SA78	Avilés	m1	s2	-	pos	430
49	IB7	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
50	IB1	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
51	IB22	Ibiza	m2	s1	/1	pos	430
52	IB23	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
53	IB6	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
54	IB19	Ibiza	m1m2	s2	-	pos	430
55	IB78	Ibiza	m1	s1	-	pos	610
56	IB54	Ibiza	m2	s1	/1		430
57	IB34	Ibiza	m2	s2	-		430
58	IB25	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
59	IB3	Ibiza	m2	s1	/1	pos	430
60	IB18	Ibiza	m1m2	s2	-	pos	430
61	IB2	Ibiza	m1	s1	-	pos	430
62	IB79	Ibiza	m1	s2	-	pos	610
63	IB17	Ibiza	m2	s2	-		430
64	IB10	Ibiza	m1	s2	-	pos	430

#### 4.4.3.1 Detección del gen *cagA*.

Se estudió la presencia del gen *cagA* en un total de 62 cepas, aisladas en diferentes regiones de España, de las cuales 36 (58%) eran positivas para este gen y 26 (42%) eran negativas.

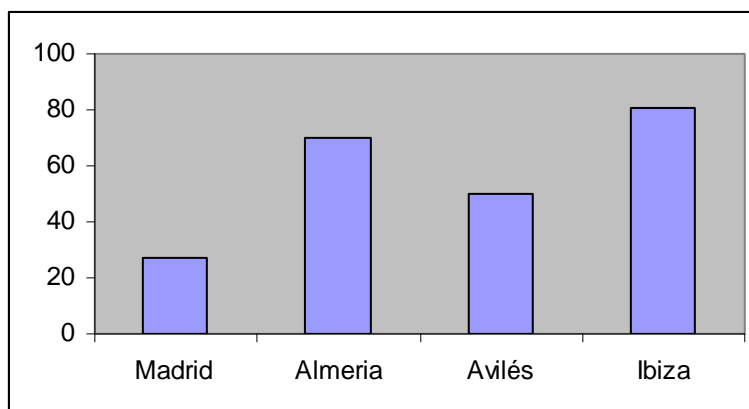
Gráfico 4.4.3.1 a- Detección del gen *cagA*.



De las 26 cepas que fueron *cagA* -, todos los casos se confirmaron que eran realmente negativas por la PCR “empty-site”. Dos cepas fueron excluidas de este estudio porque no se consiguió amplificación para ninguna de las dos PCR (empty-site, ni *cagA*), ni tampoco se consiguió amplificación para la PCR específica de la determinación de la parcialidad de la “isla de patogenicidad *cagA*”.

De las 36 cepas positivas para el gen *cagA* se estudió cual era la procedencia de las cepas, obteniéndose los datos que se pueden ver en la gráfica adjunta.

Gráfico 4.4.3.1 b- Detección del porcentaje del gen *cagA* en función de la región de España.



Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa si se compara Madrid con el resto de España (OR 8.81  $p < 0.0000$  por  $\chi^2$  análisis).

#### 4.4.3.1.1 Detección de tipos y número de fosforilaciones EPIYA.

Se estudiaron 36 cepas *cagA* positivas para ver el número y tipo de fosforilaciones EPIYA que poseían. Sólo se consiguió buena señal de secuenciación en 25 (69.4%) de estas cepas. 14 (53.8%) presentaron en su secuenciación del gen *cagA* tres EPIYA (A, B, C).

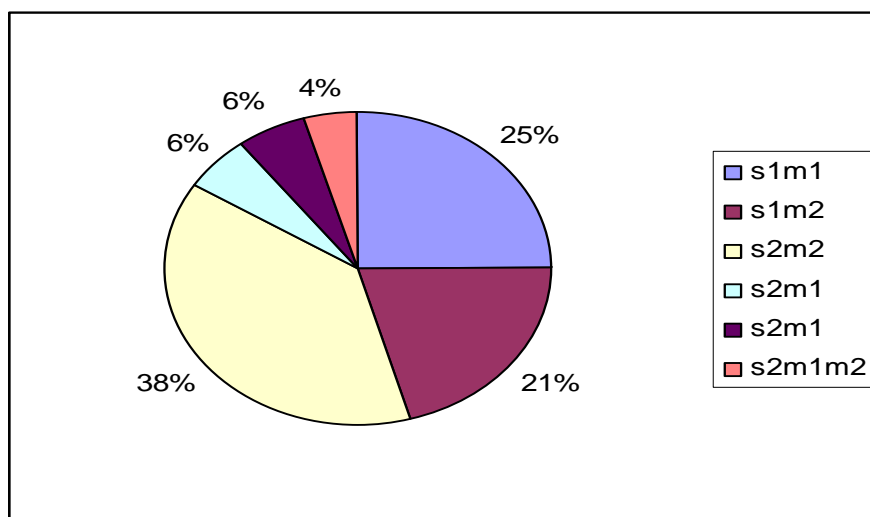
Tabla 4.4.3.1.1 Tabla de número y tipos de motivos de fosforilación EPIYA.

Cantidad de motivos de fosforilación EPIYA	Tipos de motivos de fosforilación EPIYA	Madrid (n=6) n	Almería (n=12) n	Avilés (n=3) n	Ibiza (n=4) N
3	ABC	2	7	3	2
3	ABD	0	0	0	0
4	ABCC	2	5	0	0
4	ABBC	2	0	0	2

#### 4.4.3.2 Detección de las distintas combinaciones alélicas del gen *vacA*.

Se estudió en un total de 64 aislamientos la presencia de los alelos *s1* o *s2* y *m1* o *m2* del gen *vacA*. En todos los aislamientos se detectó uno de los dos alelos. De las 64 cepas en 26 (38%) se detectó la presencia de la combinación del gen *vacA* *s2m2*.

Gráfico 4.4.3.2 Distribución de los alelos del gen *vacA*.



#### 4.4.3.2.1 Distribución por regiones de las distintas combinaciones alélicas del gen

*vacA*.

Se determinó la distribución de los alelos *s1* o *s2* y *m1* o *m2* en 22 cepas de Madrid, 20 de Almería, 16 de Ibiza y 6 procedentes de Avilés. Los resultados vienen expresados en la siguiente tabla.

Tabla 4.4.3.2.1 Distribución de las combinaciones alélica según la procedencia geográfica.

	Madrid (n=22)	Almería (n=20)	Ibiza (n=16)	Avilés (n=6)
<i>s1m1</i>	4	5	7	1
<i>s1m2</i>	1	9	3	1
<i>s2m2</i>	16	5	2	3
<i>s2m1</i>	1	0	2	1
<i>m1m2s2</i>	0	1	2	0

#### 4.4.3.3 Determinación de la región intermedia del gen *vacA*.

Se estudió la relación de la región intermedia del gen *vacA* en las cepas que habían tenido la combinación alélica *s1m2*. De las 14 cepas que tenían esta combinación alélica todas tenían la región intermedia *i1* del gen *vacA*.

Tabla 4.4.3.3 Relación de las los alelos *s* y *m* de la región *vacA* con la región intermedia del gen *vacA*.

	<b>N</b>	<b><i>i1</i> :CLUSTER B QASE.ITS</b>	<b><i>i2</i>: CLUSTER B KSSEKITSRE</b>	<b><i>i1</i>: CLUSTER C AS.-----SV</b>	<b><i>i2</i>: CLUSTER C VSSSN.SV D</b>
<i>s1m2</i>	14	14	0	14	0



#### 4.4.3.4 Relación entre el gen *vacA* y gen *cagA*.

Se estudió en un total de 64 cepas la presencia o ausencia del gen *cagA* con la presencia de una determinada combinación alélica.

Del total de las cepas estudiadas, en 36 (58%) se detectó la presencia del gen *cagA* y en el 100% se detectó una combinación alélica distinta a *s2m2*, como se puede ver en la tabla adjunta.

Tabla 4.4.3.4 a- Relación global entre el gen *cagA* y los alelos del gen *vacA*

	N	<i>cagA</i> + (n=36)		<i>cagA</i> - (n=26)		IND (n=2)	
		n	%	n	%	n	%
<i>s1m1</i>	17	17	47.2	0	0	0	0
<i>s1m2</i>	14	12	33.3	1	3.8	1	50
<i>s2m2</i>	26	0	0	25	100	1	50
<i>s2m1</i>	4	4	11.1	0	0	0	0
<i>M1m2s2</i>	3	3	8.3	0	0	0	0

En las siguientes gráficas se puede ver la relación con el estado *cagA* y *vacA* según el lugar geográfico.

Tabla 4.4.3.4 b- Estudio en la región de Madrid de los genes *cagA* y *vacA*.

	N	<i>cagA</i> + (n=6)	<i>cagA</i> - (n=16)
		n	n
<i>s1m1</i>	4	4	0
<i>s1m2</i>	1	1	0
<i>s2m2</i>	16	0	16
<i>s2m1</i>	1	1	0
<i>m1m2s2</i>	0	0	0

## Resultados

Tabla 4.4.3.4 c- Estudio en la región de Almería de los genes *cagA* y *vacA*.

	N	<i>cagA</i> + <u>(n=14)</u> n	<i>cagA</i> - <u>(n=5)</u> n	IND <u>(n=1)</u> N
<i>s1m1</i>	5	5	0	0
<i>s1m2</i>	9	8	0	1
<i>s2m2</i>	5	0	5	0
<i>s2m1</i>	1	1	0	0
<i>m1m2s2</i>	0	0	0	0

Tabla 4.4.3.4 d- Estudio en la región de Avilés de los genes *cagA* y *vacA*.

	N	<i>cagA</i> + <u>(n=3)</u> n	<i>cagA</i> - <u>(n=2)</u> n	IND <u>(n=1)</u> N
<i>s1m1</i>	1	1	0	0
<i>s1m2</i>	1	1	0	0
<i>s2m2</i>	3	0	2	1
<i>s2m1</i>	1	1	0	0
<i>m1m2s2</i>	0	0	0	0

Tabla 4.4.3.4 e- Estudio en la región de Ibiza de los genes *cagA* y *vacA*.

	N	<i>cagA</i> + <u>(n=13)</u> n	<i>cagA</i> - <u>(n=3)</u> n
<i>s1m1</i>	7	7	0
<i>s1m2</i>	3	2	1
<i>s2m2</i>	2	0	2
<i>s2m1</i>	2	2	0
<i>m1m2s2</i>	2	2	0

Al igual que ocurría al analizar los resultados de una forma global, se observó una alta relación entre la existencia del gen *cagA* – con la combinación alélica *s2m2* en todas las regiones estudiadas.

#### 4.4.4 Estudio de la presencia de genes informativos con la procedencia geográfica de las cepas de *Helicobacter pylori*.

##### 4.4.4.1 Detección de la presencia *ins180 pb*.

Se estudió en un total de 64 cepas la presencia de la inserción de 180 pares de bases que podía dar información del origen africano de las cepas. Se detectó en 9 (14.1%) de las cepas. En la tabla adjunta podemos ver la distribución de la presencia de esta inserción según las diferentes áreas geográficas.

Figura 4.4.4.1 Detección de la inserción de 180 pares de bases.

	Total		Madrid	Almería	Avilés	Ibiza
	n	%	n	n	n	n
<b><i>Ins 180 pb</i></b>	9	14.1	4	2	1	2

#### 4.4.4.2 HspA (Heat Shock Protein).

Se secuenció una parte del gen que codifica la proteína de choque térmico HspA para determinar la procedencia geográfica de las cepas. Del total de las 64 cepas estudiadas, en 7 no se consiguió buena señal en la secuenciación en el dominio A. De las 57 cepas en las que sí se consiguió, en 17 (26.6%) se encontró la secuencia con origen asiático, detallándose en la siguiente tabla según la región geográfica.

Tabla 4.4.4.2 a- Genotipos geográficos determinados por la secuencia amino terminal del gen *hspA*.

Secuencia de aminoácidos del dominio A																					n	Madr	Alm	Ibi	Av
Cepa de referencia	L	I	T	I	S	A	K	F	L	F	Y	L	S	K	L	R	R	T	E	M	38	16	10	11	1
1 <sup>a</sup>	-	R	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	4	7	2	4
2	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	0	1	0
3	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0	1	0	0

<sup>a</sup> Origen asiático.

Del total de las 64 cepas estudiadas, en 6 no se consiguió buena señal en la secuenciación en el dominio B. De las 58 cepas en las que sí se consiguió, en 6 (10.3%) se encontró la secuencia con origen asiático y en 8 (13.8%) se encontró la secuencia con origen africano, detallándose en la siguiente tabla según la región geográfica.

## Resultados

Tabla 4.4.4.2 b- Genotipos geográficos determinados por la secuencia amino terminal del gen *hspA*.

Cepa de referencia	90	Secuencia de aminoácidos del dominio B												Total n=58	Mad n=20	Alm n=18	Ibi n=14	Avi n=6
		G	S	G	S	C	C	H	T	G	N	H	100					
1 <sup>a</sup>		S	-	-	-	-	-	-	-	N	S	-		2	2	0	0	0
2 <sup>a</sup>		S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		4	1	3	0	0
3 <sup>b</sup>		-	A	-	-	-	-	-	A	N	S	-		5	0	0	5	0
4 <sup>b</sup>		-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-		3	0	1	0	2

-<sup>a</sup> Origen asiático.

-<sup>b</sup> Origen africano.

Se estudio la relación entre el dominio A y B, y se encontró que solamente en 3 (5.2%) de las cepas que tuvieron alguna de los dos dominios característicos de cepas de origen asiático, realmente tenían coincidencia en las dos dominios. Estas tres cepas fueron aisladas en Almería.

Tabla 4.4.4.1 c- Genotipos geográficos determinados por la secuencia amino terminal del gen *hspA*.

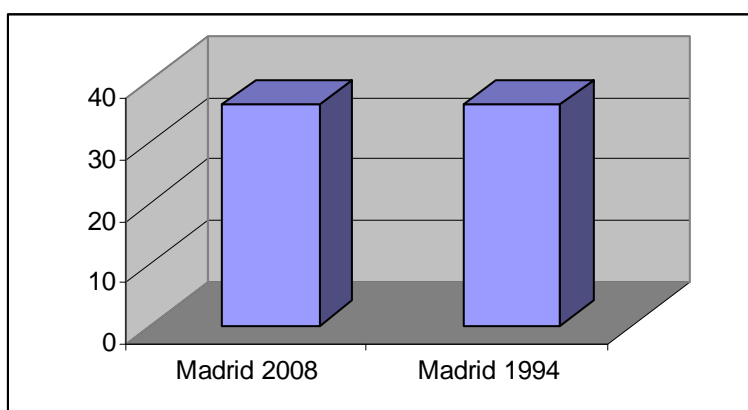
Designation																Amino Acid sequence	Total n=58	Madrid n=20	Almeria n=18	Ibiza n=14	Aviles n=6
1 <sup>b</sup>	-	R	I	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	NS	3	0	3	0	0

## 4.5 RELACIÓN ENTRE LAS CEPAS AISLADAS EN 2008 Y EN 1994.

### 4.5.1 Cambio de sensibilidad a claritromicina en los dos períodos de tiempo.

En el año 2008 se encontró una resistencia a claritromicina del 36% mediante métodos fenotípicos, en Madrid. En las cepas aisladas en el año 1994 en España, se encontró una resistencia a claritromicina del 16%. Pero si comparamos solamente la región de Madrid en estos años, se puede observar que la resistencia a claritromicina no ha variado.

Tabla 4.5.1 Comparación de sensibilidad a claritromicina en diez años, en Madrid.



## 4.5.2 Cambios genotípicos en los factores de virulencia en los dos períodos de tiempo.

### 4.5.2.1 Cambios en el gen *vacA*.

La combinación alélica más frecuente del gen *vacA* en la región de Madrid en ambos periodos de tiempo, 1994 y 2008, fue *s2m2*. El alelo predominante en el resto de las tres regiones fue el *s1*, obteniéndose un alto porcentaje en Almería e Ibiza.

Tabla 4.5.2.1 Comparación del gen *vacA*.

	<i>N</i>	<i>s1m1/m2</i>		<i>s2m2</i>		<i>s2m1</i>	
		n	%	n	%	n	%
Madrid	22	5	22.7	16	72.7	1	4.5
Almería	20	14	70.0	5	25	1	4.5
Avilés	6	2	33.3	3	50	1	16.7
Ibiza <sup>1</sup>	16	10	62.5	2	12.5	2	12.5
Madrid 2008 <sup>2</sup>	118	38	32.2	72	61.1	4	3.3

<sup>1</sup>2 cepas mostraron señal mixta.

<sup>2</sup>4 cepas mostraron señal mixta.

### 4.5.2.2 Cambios en el gen *cagA*.

El menor porcentaje de cepas *cagA* positivas se obtuvo en Madrid, tanto en el periodo de 1994 como en el periodo del 2008. Obteniéndose una diferencia con el resto de regiones de España, donde se detectó la presencia del gen *cagA* en un mayor porcentaje, en especial en Almería e Ibiza.

Tabla 4.5.2.2 Comparación del gen *cagA*.

	<i>N</i>	<u>cag A+</u>		<u>cagA-</u>		<u>Indeterminad</u>	
		n	%	n	%	n	%
Madrid	22	6	27.3	16	72.7		
Almería	20	14	70	5	25	1	5
Avilés	6	3	50	2	33.3	1	16.6
Ibiza	16	14	87.5	2	12.5		
Madrid 2008	118	44	37.3	74	62.7		

#### 4.5.2.2.1 Comparación de los motivos de fosforilación EPIYA.

Se comparó la cantidad y tipos de motivos de fosforilación EPIYA en las cepas aisladas en España en 1994 y en las cepas aisladas en Madrid. En todas las cepas se observó que el EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C, son las repeticiones más frecuentemente encontradas en los dos períodos de tiempo. Excepto en las cepas de Madrid aisladas en 1994, pero podría ser por el escaso número de cepas estudiadas.

Tabla 4.5.2.2.1 Tipos y cantidad de motivos de fosforilación EPIYA.

Cantidad de motivos de fosforilación EPIYA	Tipos de motivos de fosforilación EPIYA	Nº total	Mad 2008 n=25 n	Mad 1995 n=6 n	Alme n=13 n	Avilés n=3 n	Ibiza n=4 n	No españoles n=19 n
<b>Cepas</b>								
< 3	A/AC	2	1	0	0	0	0	1
3	ABC	42	17	2	7	3	2	11
3	ABD	2	0	0	0	0	0	2
>3	Varios	23	7	4	5	0	2	5



# **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo hemos estudiado la resistencia a claritromicina en cepas de *H. pylori* mediante diferentes métodos moleculares, viendo la posible asociación de los factores de virulencia del microorganismo y dicha resistencia.

### **5.1 Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* y su sensibilidad a claritromicina mediante técnicas de biología molecular: PCR a tiempo real y PCR convencional con hibridación reversa.**

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del DNA de *H. pylori* directamente en la biopsia gástrica. La mayoría de las técnicas se basan en la PCR tanto clásica como a tiempo real y presentan diferentes objetivos de diagnóstico, siendo fundamentales los siguientes: la detección de genes específicos de la bacteria, de los factores de virulencia y de los mecanismos de resistencia (Doorn 2001).

La PCR tanto clásica como a tiempo real se ha utilizado con éxito para estudiar la resistencia a claritromicina puesto que son capaces de detectar mutaciones puntuales en el gen 23S RNAr, que confieren resistencia a este antimicrobiano (López-Brea 2006). La resistencia a macrólidos observada en *H. pylori* es debida a una mutación en una secuencia de la región peptidiltransferasa 23S del RNAr en la subunidad 50S. La mutación que se encuentra más frecuentemente en aislamientos clínicos es la A2143G, seguida de la mutación A2142G y en menor proporción la mutación A2142C.

La PCR en tiempo real, se basa en la amplificación y la detección del producto amplificado de forma simultánea. Se utilizan secuencias complementarias a las secuencias de interés. Al ir marcadas con fluorocromos, a medida que se amplifica el fragmento seleccionado, se detecta la emisión de fluorescencia (Reganath 2004). Previamente a la realización de la PCR se necesita utilizar un método de extracción que sea eficaz y con el que se obtengan excelentes resultados. En este trabajo, se ha utilizado un nuevo método para la extracción automática de DNA a partir de biopsia gástrica. Con este nuevo método se facilita la extracción, se evita la manipulación y se obtienen buenos resultados.

En nuestro estudio se compararon los resultados de la PCR a tiempo real con los del cultivo tradicional. De las 106 biopsias en las que se hizo la PCR a tiempo real, en 62 se produjo amplificación. 56 de estas 62 cepas tuvieron crecimiento en cultivo y las 6 cepas restantes fueron positivas por PCR pero fue negativo su cultivo. Esta discrepancia puede ser principalmente porque *H. pylori* es un organismo muy lábil que se contamina con facilidad, inhibiéndose su crecimiento.

La sensibilidad y la especificidad de la prueba fueron altas, de un 93% y un 87%, respectivamente. La principal ventaja de la PCR a tiempo real es que es una técnica muy rápida, en una hora se pueden obtener resultados fiables después de realizar la extracción de ADN, mientras que el cultivo de la biopsia gástrica es más lento, debido a que *H. pylori* es un organismo microaerofílico de crecimiento lento.

Cuatro biopsias fueron positivas por cultivo y sin embargo el resultado de la PCR fue negativo; la extracción de DNA fue correcta, ya que la amplificación por PCR del gen de la  $\beta$ -globina humana fue positiva. Este resultado discrepante podría ser por una concentración baja del microorganismo en la muestra de biopsia gástrica.

En cuanto a los datos de sensibilidad a la claritromicina comparando ambos métodos, de las 56 biopsias estudiadas que tuvieron un cultivo positivo para *H. pylori* y una amplificación positiva mediante PCR, 32 (57%) fueron sensibles a claritromicina por E-test y en tres casos se encontraron discrepancias con el método genotípico, esto puede ser principalmente porque se trate de una infección mixta que presente una cepa sensible y otra cepa resistente a claritromicina y en cada uno de los métodos se ha detectado una distinta. En el caso de las cepas que resultaron resistentes a claritromicina mediante E-test que fueron 24 (42%), en una de ellas, también hubo discrepancia con respecto al método de biología molecular utilizado en este estudio. La explicación podría ser que la infección estuviera producida por una cepa sensible y otra resistente. Algunos autores han descrito que las cepas resistentes son de crecimiento más lento en cultivo que las cepas sensibles (Wang 1998). Esto podría explicar el caso de una infección mixta en la que se detectaría por cultivo sólo la cepa sensible. O bien, que se trate de una cepa que tenga un mecanismo de resistencia distinto al estudiado con el método utilizado.

Otra técnica de amplificación de ácidos nucleicos que ha resultado de gran utilidad es la hibridación en fase sólida. Esta técnica se basa en la amplificación de una

secuencia diana, y su posterior hibridación, en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para diferentes genes de *H. pylori*.

Se estudiaron 63 muestras de biopsias obtenidas de pacientes pediátricos. Se realizó la PCR convencional y un posterior revelado mediante hibridación para ver la presencia de *H. pylori* y detectar la resistencia a claritromicina. Posteriormente se secuenció el producto amplificado para ver la correlación y la mutación que confería resistencia a claritromicina.

De las 63 biopsias estudiadas 24 (38.1%) fueron positivas y 27 (43%) negativas para *H. pylori* tanto por cultivo como por PCR. Once biopsias fueron positivas mediante este método genotípico pero negativas por cultivo. Una biopsia fue positiva por cultivo y sin embargo el resultado de la hibridación en fase sólida fue negativo; la extracción fue correcta, ya que la amplificación por PCR del gen de la  $\beta$ -globina humana fue positiva. Este resultado discrepante puede ser debido a que el microorganismo presente en la biopsia esté en pequeña cantidad.

La sensibilidad y la especificidad fueron de un 96% y 71%, respectivamente. La principal ventaja de esta técnica es la fácil interpretación de los resultados.

De las 24 muestras que tuvieron resultado positivo para *H. pylori* mediante cultivo y mediante este método de biología molecular, 11 (45.8%) fueron infectados por una cepa resistente y 13 (54.2%) fueron infectados con una cepa sensible a claritromicina por E-test. En 2 cepas se encontraron discrepancias con el método genotípico, 1 cepa era resistente por E-test y sensible mediante biología molecular, puede ser porque el mecanismo que le confiere resistencia a claritromicina sea en una región distinta a la

estudiada. En el caso de la otra cepa en la que se encontró discrepancia, fue sensible por E-test pero resistente a claritromicina mediante PCR.

Se encontraron 3 cepas que eran heteroresistentes, tenían doble señal en la tira de nitrocelulosa, esto significaba que el paciente estaba infectado por una cepa sensible y otra resistente a claritromicina simultáneamente o que la mutación se encontraba sólo en 1 de las 2 copias del gen RNA que tiene esta bacteria.

Se amplificó y posteriormente se secuenció una región de 695 pares de bases del 23S del RNA ribosómico en las 35 muestras de biopsia que habían sido positivas mediante PCR y posterior hibridación, pero solamente se consiguió en 19 de los 35 casos una buena señal en los cromatogramas de la secuenciación. Obteniéndose en estos casos plena correlación con los datos obtenidos por hibridación en fase sólida.

Si se comparan los resultados de los dos métodos de biología molecular (PCR en tiempo real y PCR convencional con hibridación en fase sólida), en ambos casos se han obtenido excelentes resultados tanto de especificidad como de sensibilidad, siendo algo mejores en la PCR a tiempo real, además este método tiene la ventaja de ser rápido ya que en sólo una hora se obtendrían los resultados. Por otro lado la hibridación en fase sólida, aunque es algo más lenta, ya que la amplificación y la detección no se realizan de manera simultánea, los resultados, sí son más fáciles de interpretar y permite detectar también la resistencia a fluorquinolonas, aunque no se ha analizado en este trabajo.

Un posible inconveniente del kit utilizado para la realización de la PCR a tiempo real es la carencia de control interno, mientras que las tiras de nitrocelulosa utilizadas

para la hibridación en fase sólida, poseen un control de amplificación, con el fin de que cuando se obtienen resultados negativos se puede conocer si es un verdadero negativo o si ha habido una inhibición de la amplificación.

Hay muchos estudios publicados que utilizan tanto PCR como PCR en tiempo real para detectar *H. pylori* y su resistencia a claritromicina o a otros antibióticos de primera línea utilizados para el tratamiento frente *H. pylori* como son quinolonas, tetraciclinas o rifampicina (Chisholm 2009, Lawson 2005). La mayoría de las PCR a tiempo real encontradas en la literatura no son kits comerciales, pero todos ellos obtienen una buena sensibilidad y especificidad para detectar las cepas resistentes a claritromicina (Lacols 2003). Schabereiter-Gurtner *et al.* usaron un kit comercial basado en una PCR a tiempo real, para la detección de *H. pylori* y su resistencia a claritromicina, con una sensibilidad y una especificidad para la detección de claritromicina del 82% y 100% respectivamente. El inconveniente de este estudio fue que se incluyeron muy pocas cepas resistentes a claritromicina (Schabereiter-Gurtner 2004).

En la revisión bibliográfica que hemos realizado hemos encontrado un artículo publicado acerca de la detección de *H. pylori* y su resistencia a claritromicina mediante este nuevo kit comercial basado en la hibridación en fase sólida, con resultados parecidos a los nuestros (Cambau 2009).

Los métodos moleculares pueden llegar a tener mayor rentabilidad que los métodos tradicionales, ya que el cultivo se puede contaminar debido al lento crecimiento del microorganismo. En nuestro estudio se ha podido comprobar que hay cepas que no crecen en cultivo pero si son positivas mediante biología molecular, hay otros estudios realizados previamente que corroboran la alta rentabilidad de estos métodos (Chisholm

2008). Sin embargo, el cultivo sigue siendo imprescindible para la detección de resistencia a otros antimicrobianos.

En conclusión, la principal ventaja de las técnicas moleculares es la rapidez en obtener los resultados acompañados de una alta sensibilidad y especificidad tanto en nuestro estudio como en otros consultados. Por otra parte, los métodos moleculares permiten detectar infecciones mixtas con cepas sensibles y resistentes simultáneamente o infecciones por cepas heterogéneas (cepas con una mutación en una de las dos copias del gen), que pueden pasar desapercibidas por los métodos fenotípicos. La principal desventaja, es que de momento sólo sirve para detectar resistencia a macrólidos y fluorquinolonas.



## 5.2 Estudio de la sensibilidad a claritromicina.

*H. pylori* es una de las mayores causas de gastritis crónicas y úlceras pépticas. Las pautas de tratamiento para erradicar *H. pylori* combinan 2 ó 3 antimicrobianos junto con un compuesto anti-ulceroso (una bomba inhibidora de protones o sales de bismuto), que permite modificar el pH del estómago para que actúe el antibiótico. La duración de la terapia habitual ha sido de 7 a 10 días.

Antes de iniciar una pauta de tratamiento se debe considerar el porcentaje de resistencia a los antimicrobianos en esa población o área geográfica. Se recomienda la pauta de tratamiento triple con un inhibidor de la bomba de protones y dos antimicrobianos como primera opción. Si este tratamiento falla, se debe evitar repetir dos veces la misma pauta y se recomienda realizar estudios microbiológicos antes de iniciar una nueva pauta. La resistencia a los antimicrobianos es la principal causa de fallo del tratamiento. La gravedad de la inflamación gástrica, las dosis del antiulceroso y la naturaleza de la patología (ulcerosa versus enfermedad no ulcerosa) también puede afectar al éxito de la terapia. En los últimos años se han publicado numerosas guías sobre el tratamiento de la infección por *H. pylori* que recomiendan tratamiento con triple terapia, dos antibióticos al día (claritromicina, amoxicilina o metronidazol) más un antiulceroso durante dos semanas. Estos medicamentos son considerados los más efectivos contra la infección producida por *H. pylori*. El principal problema que nos podemos encontrar al utilizar este tratamiento es el aumento de las resistencias a antibióticos.

La relevancia clínica de la sensibilidad o resistencia a un determinado antimicrobiano *in vitro* se mide entre otros parámetros mediante la erradicación o no del microorganismo tras una pauta de tratamiento. Existen factores del paciente que pueden influir o incluso predecir de alguna manera el fallo de una pauta terapéutica, como es el caso del tabaquismo, pacientes tratados previamente con antagonistas de los receptores de histamina tipo 2, pacientes no cumplidores o en aquellos en los que la densidad bacteriana es muy alta. No obstante, parece ser que uno de los mejores factores para predecir el fallo en la erradicación del microorganismo es la resistencia al antimicrobiano (López-Brea 1999).

Claritromicina es el antibiótico más utilizado para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, desde que se comprobó el fuerte efecto bactericida *in vitro* comparado con otras moléculas probadas. Desafortunadamente, la resistencia primaria a claritromicina se está incrementando en todo el mundo, pero el nivel de resistencia varía en las diferentes áreas geográficas. Se ha descrito que la gravedad de la inflamación gástrica, la dosis del inhibidor de la bomba de protones utilizada y la patología que produce la infección por *H. pylori* afecta al éxito del tratamiento con claritromicina (Domingo 2002).

En nuestro estudio referente a cepas aisladas en la actualidad, se ha encontrado que la resistencia de *H. pylori* a claritromicina es alta, cercana al 30 %. En España y otros países de Europa, incluido Francia, Portugal, Polonia, Turquía y Bulgaria, se ha observado un incremento de la resistencia a claritromicina en los últimos años (Glupeczynski 2001, Koletzko 2006, Boyanova 2006, Francesco 2007). Por el contrario en

el Norte de Europa no se ha obtenido este incremento. Esta diferencia probablemente depende del consumo de macrólidos en los diferentes países.

En nuestra población de estudio se incluían el 24% de pacientes nacidos fuera de España, y de estos el 50% procedían de Sudamérica, y el 25% de países del Este de Europa, donde los niveles de resistencia a claritromicina son mucho menores (Boyanova 2009). De acuerdo con esto, en nuestro estudio encontramos niveles más altos de resistencia a este antibiótico en pacientes nacidos en España, que en pacientes extranjeros.

Los nuevos macrólidos fueron comercializados en España a principios de los años 90, y la claritromicina concretamente en el año 1991. Se ha citado que es muy frecuente tratar con macrólidos infecciones del tracto respiratorio superior (López-Brea 1997). Comparando este trabajo con otros de similares características realizados previamente en nuestro hospital, el porcentaje de resistencia a claritromicina durante 1999 y 2000 fue de un 29.16% (28 aislamientos de 96 fueron resistentes a claritromicina); y la resistencia se incrementó a un 56.6 % en el período 2002-2006 (López-Brea 2001, Agudo 2008). La resistencia a este antibiótico se ha visto incrementada considerablemente, también en nuestro trabajo cuando se comparan los resultados obtenidos en los aislamientos clínicos del 2008 y los aislamientos clínicos del año 1994, dónde se encontró una resistencia a claritromicina del 16%.

Hubo una gran diferencia de resistencia a claritromicina entre los aislamientos de estos dos periodos, si se mira más en detalle, se ve también una gran diferencia del porcentaje de resistencia a claritromicina entre las cepas aisladas en Madrid en 1994 y el resto de España. Del 16 % de cepas resistentes a claritromicina en el año 1994, el 68 % se

encontraron en Madrid. De esto se puede deducir que antes de iniciar un tratamiento empírico frente a la infección por *H. pylori* es importante conocer la resistencia local a dicho antibiótico (Megraud 2004, Kobayashi 2007).

La resistencia a claritromicina se produce principalmente por mutaciones en la región peptidiltransferasa de la subunidad 23S del RNAr (Domingo 1998). El punto más frecuente de mutación encontrado en los dos periodos de tiempo estudiados fue en la posición A2143G. Esta mutación es la que más frecuentemente produce resistencias a claritromicina tanto en nuestra región, como en el resto de Europa, Japón y China, según publicaciones previas (Francesco 2007, Liu 2008).

Se observaron discrepancias en ocho cepas estudiadas de los aislamientos clínicos del año 2008, en las que se encontró resistencia a claritromicina mediante métodos fenotípicos pero no se encontró ninguna mutación en la región estudiada del 23S RNA ribosómico. En estas cepas se amplificó y posteriormente se secuenció un fragmento de 695 pares de bases. En esta secuencia se buscaron mutaciones menos frecuentes como: A2115G, G2141A, C2147G, T2190C, C2195T, A2223G y C2694A, que habían sido asociadas con resistencia a claritromicina por distintos autores (Hao 2004, Fontana 2002, Rimbara 2008, Kim 2008, Francesco 2009), pero no se encontró ninguna mutación. El que no se hayan encontrado mutaciones en estas cepas puede ser porque la mutación que confiere resistencia a claritromicina se encuentre en un sitio distinto al estudiado en la región 23S del RNA ribosómico; u otro sitio diferente del RNA ribosómico, como pueden ser bombas de expulsión activas (Liu 2008).

Otra posible explicación sería que *H. pylori* contiene dos copias del operon 23S del RNA ribosómico (Taylor 2008). Las secuencias del 23S RNA ribosómico pueden tener mutaciones en una copia del gen y no en la otra y en este caso se puede inducir la mutación en la otra copia con pequeñas concentraciones de claritromicina, como por ejemplo utilizando las tiras de E-test. Además, podría ser que la infección estuviera producida por una cepa sensible y otra resistente. Las cepas resistentes son de crecimiento más lento en cultivo que las cepas sensibles. Esto podría explicar el caso de una infección mixta en la que se detectara por cultivo sólo la cepa sensible.

El desarrollo por parte de Verlasovic *et al* de una PCR que amplificaba una región del dominio V del 23 S RNA ribosómico y la posterior digestión del mismo con la enzima de restricción (*Bsa*) hacen más sencillo el estudio de las mutaciones existentes relacionadas con la resistencia a claritromicina. La enzima *BsaI* detecta la mutación en la posición A2143G. Todas las cepas de los aislamientos clínicos del año 2008 que previamente se habían visto que poseían la mutación en la posición A2143G fueron digeridas con la enzima *BsaI*, mientras que no fueron digeridos con el enzima, 2 aislamientos que poseían la mutación en la posición A2142G y los 10 aislamientos en los que no fueron encontradas ninguna mutación.

Otro estudio que hemos realizado en este trabajo con los aislamientos clínicos del año 2008, es ver la asociación de la claritromicina con diferentes características del paciente. En relación con la sensibilidad a claritromicina y la edad del paciente, se encontró que las cepas de *H. pylori* aisladas en niños fueron más resistentes a

claritromicina que las cepas aisladas en adultos, esto es debido a que los niños son tratados frecuentemente con macrólidos en las infecciones del tracto respiratorio, como se ha mencionado anteriormente (Pérez-Aldana 2002).

En cuanto a los pacientes que habían sido previamente tratados de la infección por *H. pylori*, se encontró que estaban más frecuentemente colonizados con una cepa resistente a claritromicina que los pacientes que no habían sido tratados frente *H. pylori*, (Adamek 1998, Heep 2000, Tüzün 2008). Este antibiótico es el utilizado más frecuentemente en la terapia triple para la erradicación de *H. pylori*. Si se revisan estudios previos realizados en nuestro hospital acerca de la resistencia secundaria a claritromicina, se encuentra un alto porcentaje de resistencia a este antibiótico (Cibrelus 2007).

### 5. 3 Estudio del gen *cagA*

Las cepas de *H. pylori* han sido diferenciadas según la expresión o no de la toxina vacuolizante (*vacA*) y la proteína codificada por el gen asociado a citotoxicidad (*cagA*), considerándose más virulentas las que tienen la presencia de esta última proteína (Censini 1997). Las cepas *cagA* positivas producen mayor daño en el epitelio, se ha propuesto como modelo que explique esto, que las cepas *cagA* + son más sensibles a la acidez, de forma que para librarse de ella deben colonizar la zona más cercana al epitelio donde el pH es alrededor de 7 interaccionando más con las células del huésped y produciendo así una mayor respuesta inflamatoria (Blaser 1997, Karita 1998).

Encontramos que en la población estudiada del año 2008, el porcentaje global de cepas *cagA*+ fue del 37%, mientras que las cepas estudiadas del año 1994 el porcentaje fue del 58%. Estudios similares llevados a cabo en nuestro hospital en el año 2006 muestran una prevalencia de cepas *cagA*+ del 51.7% (Díaz-Regañon 2006). Por otra parte, la prevalencia de cepas *cagA*+ varía según el país de estudio, en general más del 50% de las cepas *cagA*+ se encuentra en los países del este asiático (Yamaoka 2002). Estudios realizados en varios países europeos muestran resultados diferentes en cuanto a la detección del gen *cagA*, así en países del Este de Europa como Eslovenia y Turquía la prevalencia es del 61.2 % y 73 % respectivamente, mientras que en países del Norte de Europa, Suecia e Islandia, la prevalencia es mucho menor, 11 % y 36 % respectivamente (Homan 2009; Erzin 2006; Thjodleifsson 2008).

Como se ha podido comprobar con los datos anteriores, ha habido una disminución de la prevalencia de cepas *cagA* + en los últimos años en nuestro estudio, lo que indicaría una disminución de las cepas más virulentas de *H. pylori*. Sólo se ha

encontrado un estudio que compare las variaciones en este factor de patogenicidad en una región determinada. Este trabajo fue llevado a cabo en Italia, dónde al contrario que en nuestro estudio las cepas más virulentas han aumentado (Francesco 2009).

De los aislamientos del año 2008, alrededor del 21% de las cepas procedían de pacientes nacidos fuera de España. De estos pacientes el 65% eran *cagA*+, porcentaje estadísticamente significativo si se compara con los pacientes nacidos en España. Más del 50% de estos pacientes procedían de Sudamérica, dónde la prevalencia de cepas *cagA* + es superior a los países del centro y Sur de Europa. En países como Brasil o Cuba los porcentajes de cepas *cagA* + pueden ser superiores al 70% (Chiarini 2009, Mattar 2005, Torres 2009, Paniagua 2009, Gutiérrez 2005). Hay un estudio realizado en España con pacientes inmigrantes, dónde también se obtienen porcentajes de cepas *cagA*+ relativamente superiores a los porcentajes que se tienen en nuestra área actualmente (Sanz-Pelaez 2008).

En el estudio por regiones de las cepas aisladas en el año 1994 se obtuvieron porcentajes altos para el gen *cagA*+, en especial en las regiones de Almería e Ibiza, donde los porcentajes fueron del 70 y 81 %. La excepción fue Madrid donde los porcentajes de cepas *cagA*+ fueron mucho menores, de un 27%. Es importante señalar que el gen *cagA* presenta variación en sus alelos y difiere de unas cepas a otras, la aplicación de diferentes iniciadores para la detección del gen *cagA* sería de gran interés para estudiar la posible variabilidad del mismo en las cepas aisladas de diferentes zonas (Miehlke 1996; Yamaoka 2008; Schneider 2009).



CagA es una proteína altamente inmunogénica con un peso molecular de 120 y 140 KD (Covacci 1993; Tummuru 1993). La variación en el tamaño de *cagA* es debido a las secuencias repetitivas en la región 3' del gen denominadas "EPIYA motifs". Las cepas aisladas en países occidentales (países europeos y Estados Unidos) poseen la secuencia EPIYA-A y la secuencia EPIYA-B seguida del segmento EPIYA-C (Panayotopoulou 2007).

La mayoría de las cepas de países como Japón, Corea y China, también poseen los segmentos EPIYA-A y EPIYA-B pero no el segmento repetible EPIYA-C, en su lugar tienen una secuencia con un sitio EPIYA diferente, denominado segmento EPIYA-D (Argent 2004; Atherton JC 1995; Azuma T 2004; Higashi 2002). De acuerdo con esto, la mayoría de los aislamientos de *H. pylori cagA+* incluidos en el estudio de los aislamientos del 2008 o de 1994 poseían tres sitios EPIYA siendo estos el A, B y C. Solamente 2 cepas del estudio del año 2008 presentaron en su secuencia tres sitios EPIYA siendo estos A, B y D, sin encontrar ninguna relación entre esta secuencia y la procedencia de los pacientes.

Se intentó estudiar la relación, en las cepas del año 2008, entre las procedentes de pacientes nacidos fuera de España y tener una secuencia en el gen *cagA* diferente a EPIYA-A, B y C, y se encontró que el 53 % de los pacientes nacidos fuera de España tenían una secuencia distinta a esta, esta diferencia es estadísticamente significativa si se compara con los pacientes nacidos en España.

El número de sitios EPIYA se correlaciona directamente con los niveles de fosforilación de tirosina, estos hallazgos sugieren que las cepas que poseen un mayor número de sitios EPIYA son biológicamente más activas que las que tienen un menor

número (Hatakeyama 2004). Según estudios previos la incidencia de cáncer gástrico es más alta en pacientes con múltiples repeticiones comparado con los pacientes que están infectados con cepas con menos repeticiones “EPIYA motifs”. Las cepas con múltiples repeticiones tienen una reducida supervivencia en medio ácido, sugiriendo esto que pueden adquirir mayor número de repeticiones EPIYA cuando se desarrolla la atrofia y la hipoclorhidria (Yamaoka 2008). De las cepas estudiadas en el año 2008 y en el año 1994, un 26% de ellas, en cada periodo de tiempo poseían más de tres sitios EPIYA en la secuencia 3' del gen *cagA*.

El 37.4 % de las cepas procedentes de adultos poseían más de tres sitios EPIYA en el producto amplificado del gen *cagA*. Mientras que sólo un 15% de los aislamientos procedentes de niños tuvieron más de tres sitios EPIYA. Este hecho ya ha sido previamente observado por el grupo de Panayotopoulou *et al*, y podría ser explicado porque la bacteria fuera adquiriendo distintos sitios EPIYA durante su tiempo de colonización a lo largo de la vida (Panayotopoulou 2007).

En este trabajo encontramos que las cepas que poseían el gen *cagA* eran menos resistentes a claritromicina (48% versus 14.7%) (Broutet 2003). Esto hecho ya ha sido notificado por varios autores (Domingo 1999, Doorn 2000, Ryan 2001, Yakoob 2004, Francesco 2006). Una posible explicación podría ser que las cepas *cagA* positivas se dividen y por tanto crecen más rápidamente que las cepas *cagA* negativas. Los antibióticos son más activos durante la división de la célula, por lo tanto son más activos en las cepas que se dividen más rápidamente (Wang 1996).

Hay otras dos posibles explicaciones descritas, una de ellas es que las células *cagA* positivas producen más nivel de citoquinas pro-inflamatorias como IL-8 e IL-1 $\beta$  que las cepas *cagA* negativas, parece ser que estas citoquinas pro-inflamatorias son potentes inhibidores del ácido gástrico, como consecuencia el ambiente que crean es menos hostil para la actuación del antibiótico. Además, en relación con esto, las cepas más virulentas son las que inducen mayor inflamación en el epitelio gástrico de manera que el antibiótico puede alcanzar mayor concentración en esta zona (Sugimoto 2009).

#### 5. 4 Estudio del gen *vacA*.

La proteína VacA, que *in vitro* induce la vacuolización de las células epiteliales, está codificada por el gen *vacA*. Todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA* pero no en todos los aislamientos se manifiesta la actividad citotóxica y en los que se manifiesta no lo hace de igual manera. El gen *vacA* de *H. pylori* fue considerado desde finales de los años 80, un marcador de virulencia y al igual que ocurre con el gen *cagA* se relaciona con distintas patologías. Las diferencias genómicas en *vacA* están localizadas en la secuencia de la región señal (*s1* o *s2*) o en la región media (*m1* o *m2*).

Los alelos *s1* están más relacionados con el nivel de inflamación gástrica, la prevalencia de úlcera duodenal y con más daño en el epitelio gástrico.

En este trabajo se detecta que el gen *vacA* está presente en todas las cepas como había sido publicado anteriormente (Phadnis 1994). En los aislamientos procedentes de las cepas aisladas en el año 2008, en el 63.2 % de los casos se detectó la presencia de una combinación del gen *vacA s2m2* y en el caso de las cepas aisladas en el año 1994, la presencia de la combinación alélica *s2m2* estuvo presente en un 40.6 % de las cepas, como en otros estudios publicados anteriormente en nuestra región (Alarcón 1999).

En cuanto a las cepas estudiadas de los aislamientos clínicos del año 2008, no se encuentran diferencias significativas en la distribución de los tipos de alelos en el grupo de pacientes adultos o pediátricos. Sí que se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre la combinación alélica del gen *vacA* de los pacientes nacidos en España (*s2m2*) y los pacientes nacidos fuera de España (no *s2m2*). La distribución de los diferentes alelos del gen *vacA* se ha observado que es diferente de unos países a otros, por ejemplo en Estados Unidos las combinaciones alélicas *s1m1* o *s2m2* son igualmente

prevalentes; en el caso de Alemania o Inglaterra las combinaciones más frecuente son *s1m1* y *s1m2*, respectivamente (Francesco 2006).

Cuando se estudian los porcentajes por regiones en los aislamientos clínicos del año 1994 se observa que el alelo *s1* era el predominante en las regiones de Almería e Ibiza, en Avilés un 50 % de las cepas poseían la combinación alélica *s2m2*, mientras que en Madrid el 72 % poseían esta última combinación alélica del gen *vacA*. Si se comparan estos datos con los datos de los aislamientos del año 2008, se puede observar que la combinación alélica más frecuente en Madrid en los dos periodos de tiempo es *s2m2*.

Otra observación de nuestro estudio es que la mayoría de las infecciones producidas por *H. pylori* estaban producidas por una única cepa de dicho microorganismo, excepto en cuatro casos del 2008 y cuatro casos del 1994, todos ellos eran infecciones producidas en pacientes pediátricos. Hay discrepancias con artículos previos publicados en China o Méjico donde la infección por *H. pylori* es mucho más frecuente que esté producida por más de una cepa que a su vez presenta una combinación de múltiples mosaicos del gen *vacA* (Francesco 2006).

En nuestro estudio hemos encontrado una minoría de cepas con la combinación alélica *s2m1*, esta es una combinación raramente descrita, ya que tiene una desventaja selectiva para desarrollar la enfermedad. Se han encontrado en algunos aislamientos en trabajos de Chile, Méjico y Sudáfrica (Francesco 2008).

En cuanto a la relación del gen *vacA* con la resistencia a claritromicina, se ha observado que las cepas con la combinación alélica *s2m2* son más resistentes a dicho

antibiótico que otras combinaciones. Las cepas con combinaciones alélicas del gen *vacA* distintas a *s2m2* producen mayores cantidades de toxina, lo que induce una elevada liberación de sustancias mediadoras en los procesos inflamatorios, este aumento de la inflamación lleva consigo que los antibióticos lleguen mejor a su lugar de acción y se produzca así una más fácil erradicación de estos microorganismos (van Doorn 1997).

En este trabajo también se ha estudiado la región intermedia del gen *vacA* que parece que pueda estar relacionada según su combinación alélica con la producción de la citotoxina vacuolizante y la producción de patogenicidad. Se han estudiado las cepas *s1m2* de ambos periodos de tiempo y se ha visto que tenían en la región intermedia el alelo *i1*. Estudios recientes han demostrado que pacientes infectados con cepas con la región del gen *vacA i1* se asocian más con el desarrollo de cáncer gástrico en poblaciones de Irán y Turquía. Hasta ahora no se ha publicado ningún estudio que haga referencia a la relación de esta región del gen *vacA* y la terapia erradicadora de *H. pylori* (Rhead 2007, Sugimoto 2008).

### 5.5 Relación del gen *cagA*/*vacA*.

Es probable que sea la combinación de estos dos genes la mejor forma de expresar el poder patógeno de un aislamiento de *H. pylori* (Alarcón 2000, Qiao 2003). La combinación alélica del gen *vacA* más frecuente fue *s2m2* y fue detectada más en cepas *cagA* negativas. La presencia de *cagA* está fuertemente asociada a la presencia del alelo *s1*. La asociación del gen *cagA* y de los alelos *s1m1* del gen *vacA* se encuentra también en estudios similares realizados en otros países europeos (Francesco 2006).

En nuestro estudio se puede ver una diferencia en la sensibilidad a claritromicina entre los distintos genotipos de *H. pylori*. El presente trabajo indica que las cepas *s2m2*, *cagA* negativas son más resistentes a claritromicina que las combinaciones alélicas del gen *vacA* *s1/m1* o *m2* y *cagA* positivas, coincidiendo con artículos previamente publicados (Domingo 1999, Elviss 2004).

### **5.6 Estudio de la inserción de 180 pares de bases.**

*H. pylori* muestra una diversidad genética, atribuida a la capacidad de recombinación y la transferencia horizontal de genes. Durante el largo tiempo de colonización puede haber infección por poblaciones bacterianas genética y fenotípicamente heterogéneas.

Los estudios de las secuencias de DNA polimórficas pueden sugerir diferentes orígenes geográficos. Se ha descrito una inserción de 180 pares de bases en la región del promotor *jhp0152* en la cepa J99 y que está ausente en la cepa 26695. Parece estar relacionada con cepas procedentes de África, según estudios previos (Shannon 2004). Dada la cercanía de nuestra región a dicho continente se realizó el estudio de esta inserción, encontrándose solamente en un mínimo porcentaje de nuestras cepas (18%) y no encontrando ninguna relación con la procedencia de los pacientes. Tampoco se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia de esta inserción y los factores de virulencia o la sensibilidad a los antibióticos.



### 5.7 Estudio del gen *hspA*.

Recientemente, se ha demostrado que *H. pylori* sintetiza dos proteínas de choque térmico con diferentes características antigénicas. La proteína de choque térmico A (*HspA*) tiene dos dominios y las diferencias en la secuencia nos puede dar información de la procedencia geográfica. Hay dos estudios publicados en el que encuentran anticuerpos frente a esta proteína en un 40 % de los pacientes (Pérez-Pérez 1996; Suerbaum 1994).

El dominio A de la secuencia de esta proteína nos puede dar información de si la cepa es de procedencia africana o no, y el dominio B nos puede decir si nuestra cepa es de procedencia asiática, africana o no asiática no africana.

En nuestro estudio de las cepas del año 1994, sólo se encontraron 3 cepas procedentes de Almería que tenían una secuencia típica de la proteína *HspA* asiática.

### 5.8 Estudio MLST.

Se estudiaron las secuencias de 7 genes (*atpA*, *efp*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) de 10 cepas de *H. pylori* que poseían alguna característica especial. Se estudiaron 2 cepas procedentes de pacientes de origen gitano, para ver la procedencia de *Helicobacter* en esta población; 3 cepas que tenían la combinación alélica del gen *vacA s2m1*, ya que es muy poco frecuente; 2 cepas con la combinación alélica *s2m2* con el gen *cagA* + y tres cepas que poseían el gen *cagA*: dos con tres sitios EPIYA característicos de cepas procedentes de Asia y una con seis sitios EPIYA. Se realizó un análisis comparativo en la base de datos del “MLST” para ver si se encontraba relación con algunas de las cepas previamente publicadas pero no se encontró ninguna similitud con otras cepas publicadas en esta base de datos.

# **CONCLUSIONES**

1. La PCR a tiempo real a partir de biopsia gástrica es una técnica molecular que permite obtener resultados rápidos y con una excelente correlación con el cultivo de la biopsia.
2. La PCR convencional con posterior hibridación en fase sólida a partir de biopsia gástrica es una técnica molecular que produce resultados de fácil interpretación y con buena correlación con los métodos clásicos de diagnóstico.
3. La resistencia a claritromicina fue del 30% en los datos obtenidos de los aislamientos clínicos del año 2008 y se encontró más frecuentemente en cepas procedentes de pacientes nacidos en España, niños, con tratamiento previo frente a *H. pylori* y colonizados con cepas menos virulentas.
4. La mutación que confiere resistencia a claritromicina más frecuente fue en la posición A2143G de la secuencia 23S del RNA ribosómico.
5. La combinación de los genes de virulencia que se obtuvo más frecuentemente fue: cepas *cagA* negativas y con los alelos del gen *vacA* *s2m2*.
6. La región del gen *vacA* intermedia con el alelo *i1* está asociada con el alelo *s1* del mismo gen.

- 7. En la mayoría de las cepas estudiadas la secuencia del gen *cagA* predominante fue de tres sitios EPIYA, siendo estos A, B y C.**
- 8. Las cepas procedentes del año 1994 fueron menos resistentes a claritromicina y presentaron con mayor frecuencia el gen *cagA* y el alelo *s1* del gen *vacA*.**
- 9. No se encontró ninguna asociación entre la secuencia de inserción de 180 pb o el estudio del gen *HspA* y el lugar de procedencia del paciente.**

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. Achtman M, Azuma T, Douglas E. Berg, Ito Y, Morelli G, Pan Z, Suerbaum S, Stuart A, Ende A and Doorn L. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular Microbiology* 1999; 32: 459-70.
2. Adamek RJ, Suerbaum S, Pfaffenbach B and Opferkuch W. Primary and accquired *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin, metronidazole and amoxicillin – influence on treatment outcome. *Am J. Gastroenterol.* 1998; 93: 386 – 89.
3. Agudo S, Alarcón T, Cibrelus L, Urruzuno P, Martínez M, López-Brea M. High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. *Rev Esp Quimioter.* 2009; 22: 88 - 92.
4. Ahuja V, Sharma MP. High recurrence rate of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Gastroenterology.* 2002; 123: 653 – 54.
5. Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Antibiotics resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Intern J Antimicrob Agents* 1999; 12: 19-26.
6. Alarcón T, Domingo D, Martinez MJ, López-Brea M. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 24: 215 – 19.
7. Alarcón T, Martínez MJ, Madruga D, Domingo D, López-Brea M. One week vs two weeks triple therapy in paediatric patiens: Impact of treatment duration and metronidazole resistance. *Rev Esp Quimiotapia* 2000; 13: 55.

8. Alarcón T, Martínez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML, Madruga D, Sebastián M, *et al.* Prevalence of CagA and VacA Antibodies in children with *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer compared to prevalence in pediatric patients with active or nonactive chronic gastritis. Clin Diag Lab Immunology 2000; 7: 842-844.
9. Alarcón T, Vega E, Domingo D *et al.* Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* strains isolated from children: Prevalence and Study of Mechanism of Resistance by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. J Clin Microbiol 2003; 41: 486-88.
10. Allen LA. Rate and extend of *Helicobacter pylori* phagocytosis. Methods Mol Biol. 2008; 431: 147 -57.
11. Amieva MR, El-Omar EM. Host bacterial interactions infection. Gastroenterology. 2008; 134: 306 – 23.
12. Andrews J, Marsden B, Brown D, Wong VS, Wood E, Kelsey M. Comparasion of three stool antigen tests for *Helicobacter pylori* detection. J Clin Pathol 2001; 56: 769-771.
13. Atherton J, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene in *Helicobacter pylori*. Gastroenterol. 1997a; 112: 92 – 99.
14. Atherton J. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut. 1997b; 40: 701 – 3.
15. Bai H, Li Q, Liu X, Li Y. Characteristics and Interactions of *Helicobacter pylori* and *H. pylori*-Infected Human Gastroduodenal Epithelium in Peptic Ulcer: A Transmission Electron Microscopy Study. Dig Dis Sci. 2009.



16. Bauerfeind P, Garner R, Dunn B, Mobley H. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. Gut 1997; 40: 25-30.
17. Beswick E, Suarez G, Reyes V. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. World J Gastroenterol 2006; 12: 5599-5605.
18. Bizzozero G. Ueber die schlauchförmigen drüsen des megendarmkanals und die bazillen ihres epithels zudem oberflächenepithel der schleimhaut. Arch. F. Mikr. Anat. 1893; 42: 82 – 152.
19. Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res. 1995; 55: 2111 – 15.
20. Boyanova L, Nikolov R, Lazarova. Antibacterial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Bulgarian children and adult patients over 9 years. J Med Microbiol. 2006; 55: 65-8.
21. Boyanova L. Prevalence of multidrug-resistant *Helicobacter pylori* in Bulgaria. J Med Microbiol. 2009; 58: 930 – 35.
22. Broutet N, Tchamgoue S, Pereira E, Lamouliatte H, Salamon R and Megraud F. Risk factors for failure of *Helicobacter pylori* therapy - results of an individual data analysis of 2751 patients. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17: 99 -109.
23. Bruce MG, Maaroos HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2008;13: 1 - 6.

24. Burucoa C, Landron M, Garnier and Fauchère. T2182C mutation is not associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 868.
25. Cambau E, Allerheiligen V, Coulon C, Corbel C, Lascols C, Deforges L, Soussy CJ, Delchier JC, Megraud F. Evaluation of a New Test, GenoType(R) HelicoDR, for Molecular Detection of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 2009.
26. Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D, Raselli B, Dondi E, Boldorini R and Oderda G. Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* Strains isolated from Children Gastric Antrum and Fundus as assessed by Fluorescent *in-situ* hybridization and culture on four sector Agar plates. Helicobacter. 2008; 13: 557 – 63.
27. Cavalier-Smith T. The neomuran origin of archaeobacteria, the eubacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 7 – 76.
28. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodowsky M, Rappuoli R and Covacci A. *cagA* a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93: 14648 – 53.
29. Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. Annu Rev Physiol. 1998; 60: 161–77.
30. Cerezo S, Ponce M y Gutiérrez G. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos.

- Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*.  
Revista Latinoamericana de Microbiología. 2006; 2: 99 – 104.
31. Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'Arpa F, Giammanco A. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28: 437 - 46.
32. Chisholm S, Owen R. Application of polymerase chain reaction-based assays for rapid identification and antibiotic resistance screening of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 61: 67 – 71.
33. Chisholm S, Owen R. Frequency and molecular characteristics of ciprofloxacin and rifampicin-resistant *Helicobacter pylori* from gastric infections in the United Kingdom. J Med Microbiol. 2009.
34. Chisholm S.A, Teare E, Patel B, Owen RJ. Determination of *Helicobacter pylori vacA* allelic types by single-step multiplex PCR. Let in Appl Microbiol. 2002; 35: 42 – 6.
35. Chromvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. Int J Infect Dis 2008; 1: 30 – 6.
36. Cibrelus L, Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, Pérez de Ayala A, Díaz Regañón J, López-Brea M. Primary and secondary resistance to metronidazole and clarithromycin in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from children. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (sup. S1): S243.

37. Cibrelus LA, Pérez de Ayala A, Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, López-Brea M. In vitro efficiency of ciprofloxacin and rifampicin as potential second line treatment in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Helicobacter*. 2006; 11: 402-403.
38. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement *M100-S17*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
39. Covacci A, Telford G, Giudice D, Parsonnet J and Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999; 284: 1328 – 33.
40. Cuevas Acuña MT, López García AI, Paz Martínez D, Galindo García JA, Papaqui Tapia S, Garza Yado Mde L, Arana Muñoz O, Palacios Flores C, Pérez Fernández S. Frequency of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic urticaria of Puebla University Hospital. *Rev Alerg Mex*. 2006; 53: 174 – 8.
41. De Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Troiani L, Burattini O, Stella F, Di Leo A, Russo F, Marangi S, Monno R, Stoppino V, Morini S, Panella C, Ierardi E. Clarithromycin-Resistant Genotypes and Eradication of *Helicobacter pylori*. *Ann Intern Med*. 2006; 17: 94 - 100
42. Devi S, Ahmed I, Francalacci P, Hussain M, Akhter Y, Alvi A, Sechi L, Megraud F and Ahmed N. Ancestral European roots of *Helicobacter pylori* in India. *BMC Genomics*. 2007; 8: 2164 -184.
43. Di Lorenzo. Subcommittee on chronic abdominal pain. Chronic Abdominal pain in children. *Pediatrics* 2005; 115: 370-381.

44. Díaz-Reganon J, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. Susceptibility of 36 *Helicobacter pylori* clinical isolates to four first-line antibiotics and virulence factors. Rev Esp Quimioter. 2006; 19: 34 – 8.
45. Doenges J. L. Spirochetes in the gastric glands of macacus rhes and humans without definite history of related disease. Proc Soc Exp Med Biol. 1938; 38: 536 – 38.
46. Domingo D, Alarcón T, Prieto N, López-Brea M. Relationship between antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. Rev Esp Quimioter. 1999; 12: 340 – 5.
47. Domingo D, Alarcón T, Sanz JC, Sánchez I, López-Brea M. High frequency of mutations at position 2144 of the 23 RNAr gene in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains isolated in Spain. J Antimicrobial Chemother 1998; 40: 573-574.
48. Domingo D, Alarcón T, Vega AE, García JA, Martínez MJ, López-Brea M. Factores microbiológicos que afectan a la erradicación de *Helicobacter pylori* en población adulta y pediátrica. Enferm Infecc Microb Clin 2002; 20: 431-434.
49. Doorn L, Scheneberger PM, Nouban N, Plaisier AP, Quint WGV Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. Gut. 2000; 46: 321 – 326.
50. Doorn LJ, Glupczynski Y, Kuster JG, Megraud F, Midolo P, Maggi-Solca N, Queiroz DM, Nouhan N, Stet E, Quint WG. Accurate Prediction of macrolide resistance in *Helicobacter pylori* by PCR Line Probe Assay for detection of

- mutations in the 23 S RNAr gene: Multicenter Validation Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1500-4.
51. Doorn LJ, Quint W, Schneeberger P, Tygat GN, de Boer W. The only good *Helicobacter pylori* is a dead *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1997; 350: 71 -72.
52. Doyle J, Evans J and Evans D. *Helicobacter pylori* CagA: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of cagA as a virulence factors. *Helicobacter.* 2001; 6: 187 – 98.
53. Elviss N, Owen RJ, Xerry J, Walker A and Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 435 – 40.
54. Emilia G, Luppi M, Zucchini P, Morselli M, Potenza L, Forghieri F, Volzone F, Jovic G, Leonardi G, Donelli A, Torelli G. *Helicobacter pylori* infection and chronic immune thrombocytopenic purpura: long-term results of bacterium eradication and association with bacterium virulence profiles. *Blood.* 2007; 110: 3833-41.
55. Enders K. W. NG, Stuart A. Thompson, Guillermo I. Pérez- Pérez. Imad Kansau, Arie van der Ender, Agnes Labigne, Joseph J. Y. Sung, S.C. Sydney Chung and Martin J. Blaser. *Helicobacter pylori* Heat Shock Protein A: Serological Responses and Genetic Diversity. *Clin and Diagn Lab Immunol.* 1999; 6: 377-82.
56. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *babA* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter.* 2006; 11: 574 - 80.

57. Falsafi T, Walizadh N, Sepehr S, Najafi M. Application of a stool antigen test to evaluate the incidence of *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents from Tehran, Iran. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 1094-1097.
58. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 2005;10: 14 – 20.
59. Fontana, C., M. Favaro, S. Minelli, A. A. Criscuolo, A. Pietroiusti, A. Galante, and C. Favalli. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 3765 – 69.
60. Francesco V, Margiotta M, Zullo A *et al.* Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over a 15 year period in Italy. J Antimicrobial Chemother 2007; 59: 783-5.
61. Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Giorgi F, Zotti M, Stoppiono G, Bastianello A, Diterlizzi, Verderosa G, Morini S, Panella C, Ierardi E. *Helicobacter pylori vacA* arrangement and related diseases: a retrospective study over a period of 15 years. Dig Dis Sci. 2009; 54: 97 – 102.
62. Francesco V, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Valle N, Burattini O, D'Angelo R, Stoppino G, Cea U, Giorgio F, Monno R, Morini S, Panella C and Ierardi E. Clarithromycin Resistance and *Helicobacter pylori* Genotypes in Italy. J Microbiol. 2006; 44: 660-4.
63. Francesco V, Zullo A, Ierardi E, Vaira D. Minimal inhibitory concentration (MIC) values and different point mutations in the 23S RNAr gen for

- clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Dig Liver Dis. 2009; Editor letter.
64. Fujimura S, Kato S, Iinuma K *et al*. In vitro activity of fluoroquinolone and the *gyrA* gene mutation in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. J Med Microbiol. 2004; 53: 1019–22.
65. Garrido L and Toledo H. Novel Genotypes in *Helicobacter pylori* involving Domain V of the 23S RNAr Gene. Helicobacter. 2007; 12: 1573 – 78.
66. Glocker E, Bogdan C, Kist M. Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 874-79.
67. Glupczynski Y, Mégraud F, Lopez-Brea M, *et al*. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 820-3.
68. Godoy AP, Ribeiro M, Benvengo L, Vitiello L, Miranda M, Mendonca J, Pedrazzoli J. Analysis of molecular fingerprint and virulence factors of *Helicobacter pylori* strains. BMC Gastroenterol. 2003; 3: 1 – 6.
69. Goldman RC, Zakula R, Flamm J, Beyer and J Capobianco. Tight binding of clarithromycin, its 14-(R)-hydroxy metabolite and erythromycin to *Helicobacter pylori* ribosomes. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38: 1496 – 500.
70. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb.



- Nov. and *Helicobacter mustelae* com. Noc., respectively. Ins Syst Bacteriol. 1989; 39: 397.
71. Graham D and Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol. 2008; 5:321-31.
72. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. J Dig Dis. 2009; 10; 77 - 84.
73. Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in the pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. Gastroenterology. 1997; 113: 1983 – 91.
74. Gutiérrez B, Vidal T, Valmaña CE, Camou-Juncas C, Santos A, Mégraud F, González N, Leonard I, Martínez R, Díaz-Canel O, et al. *Helicobacter pylori* infection in Havana, Cuba. Prevalence and *cagA* status of the strains. VacciMonitor. 2005;14: 15 – 19.
75. Hamlet A, Thoreson A-C, Nilsson O, et al. Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. Gastroenterology. 1999; 116: 259–68.
76. Hao Q, Li Y, Zhang Z, Liu Y, Gao H. New mutation points in 23S RNAr gene associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in northeast China. World J Gastroenterol. 2004; 10: 1075 – 77.
77. Heep M, Kist M, Strobel S, Beck D, Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000; 19: 538 – 41.

78. Heep M, Kist M, Strobel S, *et al.* Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19: 538–41.
79. Höcker M, Hohenber P. *Helicobacter pylori* virulence factors – one part of a big picture. Lancet 2003; 362: 1231-33.
80. Homan M, Luzar B, Kocjan BJ, Orel R, Močilnik T, Shrestha M, Kveder M, Poljak M. Prevalence and clinical relevance of *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* isolated from Slovenian children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2009; Epub ahead of print.
81. Ilver D, Amqvist A, Ogren J, *et al.* *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histoblood group antigens revealed by retagging. Science 1998; 279: 377 - 379.
82. Jenks P.J, Ferrero R.L. Labigne A. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. J antimicrob Chemother. 1999. 43: 753 – 58.
83. John Albert M, Al-Mekhaizeem K, Neil L. High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori*, isolated from a multiracial population in Kuwait. Aliment Pharmacol Ther. 2006; 24: 1359 - 66.
84. Karita M, Blaser MJ. Acid tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between *cagA*<sup>+</sup> and *cagA*<sup>-</sup> strains. J Infect Dis. 1998; 178: 213 – 9.
85. Khan, R., S. Nahar, J. Sultana, M. M. Ahmad, and M. Rahman. T2182C mutation in 23S rRNA is associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*

- isolates obtained in Bangladesh. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 3567 - 69.
86. Kim J, Kim J and Known D. Mixed-Infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* strains isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. Helicobacter. 2003; 8: 202 – 206
87. Kim J, Kim J, Kim N. Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. J Antimicrob Chemother 2005; 56: 965 - 967.
88. Kim KS, Kang JO, Eun CS, Han DS, Choi TY. Mutations in the 23S RNAr Gene of *Helicobacter pylori* associated with clarithromycin resistance. J Korean Med Sci. 2002; 17: 559 – 603.
89. Kim S, Joo Y, Lee H, Chung IS, Yoo YJ, Merrell DS and Cha JH. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* clinical isolates suggests resistance to metronidazole can occur without the loss of functional *rdxA*. J Antibiotics. 2009; 62: 43 – 50.
90. Kim J, Kim H, Jung C, Kim C, Kim Y, and Song I. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from Seoul, South Korea. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 4843 – 47.
91. Kim, Mogg J, Kim J, Kim N, Kim Y, Kim IY, Chee Y, Lee CH and Jung HC. Gene mutations of 23S RNAr associated with Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Korean Patients. J Microbiol Biotechnol. 2008; 18: 1584 – 89.

92. Kivi M, Tindberg Y. *Helicobacter pylori* occurrence and transmission: a familiar affair? Scand J Infect Dis 2006; 38: 407 - 14.
93. Know DH, Hulten K, Kato M, Kim J, Lee M, El-Zaatari K, Osato M and Graham DY. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from 12 pairs of Metronidazole-Sensitive and Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates. Antimicrob Agents and Chemother. 2001; 45: 2609 – 15.
94. Kobayashi I, Murakami K, Kato M, Kato S, Azuma T, Takahashi S, Uemura N, Katsuyama T, Fukuda Y, Haruma K, Nasu M and Fujioka T. Changing antimicrobial susceptibility epidemiology of *Helicobacter pylori* strains in Japan between 2002 and 2005. J Clin Microbiol. 2007; 45: 4006 – 10.
95. Koletzko S, Richy F, Bontems P *et al.* Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut. 2006; 55: 1711 - 16.
96. Krienitz W. (1906) Ueber das auftreten von spirochaeten verschiedner form im mageningalt bei carcinoma ventriculi. Dtsch Med Wochenschr. 32: 872.
97. Kumar S, Kumar A, Dixit VK. Direct detection and analysis of *vacA* genotypes and *cagA* gene of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies by a novel multiplex polymerase chain reaction assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 17: 19 – 23.
98. Labigne A, Lamouliatte H, Birac C. Distribution of the *cagA* gene among *Helicobacter pylori* strains associated with peptic ulcer (Abstract). Am J Gastroenterol. 1994; 89: 1326.
99. Laine L, Fennerty B, Osato M, Sugg J, Suchower L, Probst P and Levine JG. Esomeprazole-based *Helicobacter pylori* eradication therapy and the effect of

- antibiotic resistance: results of three US multicenter, double-blind trials. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 3393 – 8.
100. Lascols C, Lamarque D, Costa J, Copie-Bergman C, Le Glaunec J, Deforges L, Soussy C, Petit J, Delchier J, Tankovic J. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in *H. pylori* isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4573 – 7.
101. Lawson A, Elviss N, Owen R. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 282-6.
102. M. Kato, S. Nakagawa, M. Kawarasaki, T. Nagasako, T. Mizushima, H. Oda, J. Kodaira, Y. Shimizu Lind T, Mégraud F, Unge P, et al. The MACH 2 study: role of omeprazole in eradication of *Helicobacter pylori* with 1-week triple therapies. *Gastroenterology.* 1999; 116: 248–53.
103. Liu Z, Shen J, Zhang L, Shen L, Li q, Zhang B, Zhou J, Gu L, Feng G, Ma J, You WC, Deng D. Prevalence of A2143G mutation of *H. pylori*-23S RNAr in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 81 – 9.
104. Liu Z, Zheng P, Yang P. Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance. *World J Gastronterol.* 2008; 14: 5217 – 22.

105. Long M, Luo J, Li Y, Zeng FY, Li M. Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. World J Gastroenterol. 2009; 15: 2381 - 8.
106. López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Procedimientos en Microbiología Clínica, 2004. SEIMC.
107. López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Sánchez I, Martínez MJ, Sanz JC. Evaluación de una técnica de western-blot (Helicoblot 2.0) para la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos de *Helicobacter pylori* en niños. Enferm Infecc Microbiol Clin 1998; 16: 275-9.
108. López-Brea M, Alarcón T. Novel Real Time PCR for Detection of Clarithromycin Resistance in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. Helicobacter 2006; 11: 400.
109. López-Brea M, Alarcón T. Sensibilidad a los antimicrobianos en la infección por *Helicobacter pylori*. En: López-Brea M, ed. *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science; 1999. p. 281-305.
110. López-Brea M, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Evolution of resistance to metronidazole and clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Spain. J Antimicrobial Chemother 1997; 40: 279-281.
111. López-Brea M, Jiménez M, Blanco M, Pajares JM. *Campylobacter* en patología gástrica. Microbiología 1985; 1: 97 – 99.

112. López-Brea M, Martínez J, Domingo D *et al.* A 9 year study of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 295 - 297.
113. López-Brea M, Martínez MJ, Domingo D, Sánchez I, Alarcón T. Metronidazole resistance and virulence factors in *Helicobacter pylori* as markers for treatment failure in a paediatric population. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999; 24: 404-409.
114. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain, *et al.* Concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007; 56: 772-81.
115. Marias A, Bilardi C, Cantet F, Mendz L, Mègraud. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Res Microbiol. 2003; 154: 137 -44.
116. Marignani M, Angeletti S, Bordi C. Reversal of long-standing iron deficiency anaemia after eradication of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol 1997; 32: 617 – 22.
117. Marshall B, Goodwin C. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Inf J Syst Bacteriol. 1987; 37: 68.
118. Marshall B, Royce H, Anner D.I. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbios Lett. 1984; 25: 83 – 88.
119. Mattar R, dos Santos AF, Eisig JN, Rodrigues TN, Silva FM, Lupinacci RM, Iriya K, Carrilho FJ. No correlation of *baba2* with *vacA* and *cagA* genotypes of

- Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brasil. *Helicobacter*. 2005; 10: 601 - 8.
120. Matteo MJ, Pérez V, Domingo R, Olmos M, Sanchez C and Catalano M. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with hereroresistance. *Inter J Antimicrob Agents*. 2006; 27:152 – 158.
121. McColl KEL, El Omar E, Gillen D. Interactions between *H. pylori* infection, gastric acid secretion and anti-secretory therapy. *Br Med Bull*. 1998; 54: 121–38.
122. McNulty C, Owen R, Tompkins D, Hawtin P, McColl K, Price A, Smith G, Teare L, PHLS *Helicobacter* Working Group. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemther*. 2002; 49: 601 – 9.
123. McNulty S, Mole B, Dailidienė D, Segal I, Ally R, Mistry R, Secka O, Abegbola R, Thomas J, Lenarcic E, Peek R, Berg D and Forsyth M. Novel 180 and 480 Base Pair Insertions in African and African - American Strains of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 5658 – 63.
124. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 280-322.
125. Mégraud F, Broutet N. Epidemiologie des maladies infectieuses en France en 1997. Surveillance de la résistance aux antibiotiques. *Bull Epidemiol Ann*. 1999: 187–8.
126. Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterology*. 1995; 9: 507 – 18.



127. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advantages in testing. *Gut*. 2004; 53: 1374-84.
128. Mladenova I, Durazzo M, Pellicano R. Transmission of *Helicobacter pylori*: are there evidences for a fecal-oral route? *Minerva Med* 2006; 97: 15-8.
129. Morris A, Nicholson G. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol*. 1987; 82: 192 – 99.
130. Nvström J, Svennerholm AM. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*. 2007; 25; 2591 – 8.
131. Oderda G, Shcherbakov P, Botems P, *et al.* Results from the pediatric European register for treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007; 12: 150-6.
132. Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, *et al.* Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 151-156.
133. Osawa H. Ghrelin and *Helicobacter pylori* infection *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 6327-33.
134. Owen RJ. Molecular testing for antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Gut*. 2002; 50: 285 – 9.
135. Palmer, ED. Investigation of the gastric spirochaetes of the human. *Gastroenterol*. 1954; 27: 218 – 20.
136. Panayotopoulou E, Sgouras D, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis A and Archimandritis A. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA

- protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. J Clin Microbiol. 2006; 45: 488 – 95.
137. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, Camacho A, Negrete E, Vaca S. Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009; 30: 8 - 14.
138. Parsons H. K, Carter M. J, Sandeers D.S, Winstanley T, Lobo AJ. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2001; 15: 1473 – 8.
139. Perez Aldana, L., Y. Komatsu, R. Zheng, H. Takeda, T Sugiyama, and M. Asaka. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. Helicobacter. 2002; 7: 306 - 9.
140. Pfister, P., N. Corti, S. Hobbie, C. Bruell, R. Zarivach, A. Yonath, and E. C. Bottger. 23S rRNA base pair 2057-2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A→G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102: 5180 – 85.
141. Phadnis SH, Ilver D, Janzon L. Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect Immun. 1994; 62: 1557 – 65.
142. Poddar U, Yachha S. *Helicobacter pylori* in children: an Indian perspective. Indian Pediatrics 2007; 44: 761-760.

143. Prelipcean CC, Mihai C, Gogalniceanu P, Mitrica D, *et al.* Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2007; 111: 575-83.
144. Qiao W, Hu J, Xiao B, Wu K, Peng D, Atherton J, Xue H. CagA and vacA of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. World J Gastroenterol. 2003; 8: 1762 – 1766.
145. Raffeeey H, Ghotaslau R, Nikuask S *et al.* Primary resistance in *Helicobacter pylori* isolated in children from Iran. J infect Chemother 2007; 13: 291-95.
146. Raguza D, Granato CFH, Kawakami E. Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. Dig Dis Sci 2005; 50: 453-457.
147. Rappin G. (1881). Contribution a l'étude bactéries de la bouche a l'état normal et dans la fièvre typhoid. Parent, Paris, France.
148. Regnath T, Enninger A, Schalasta. Real - time PCR assay for rapid detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. Z Gastroenterol 2004; 42:1371-5.
149. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. Gastroenterology. 2007; 133: 926 – 36.
150. Rimbara E, Kawai T, Sasatsu M. Novel mutation in 23S RNAr that confers Low-Level Resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 3465 – 66.

151. Rimbara E, Noguchi N, Kawai, *et al.* Correlation between substitutions in penicillin binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. Microbiol Immunol 2007; 51: 939-44.
152. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. J Clin Microbiol 1998; 36: 944-948.
153. Rudnicka A, Chimela M. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. Curr Trends Immunol 2004; 6: 1-19.
154. Ryan K, Doorn L, Moran A, Glennon M, Smith T and Maher M. Evaluation of Clarithromycin resistance and *cagA* and *vacA* Genotyping of *Helicobacter pylori* Strains from West of Ireland Using Line Probe Assays. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1978 – 80.
155. Salaun L and Saunders NJ. Population-associated differences between the phase variable LPS biosynthetic genes of *Helicobacter pylori*. BMC Microbiol. 2006; 6: 79 – 90.
156. Salomon H. Über das spirillum des Saugetiermagens und sein Verhalten zuden belegzellen. Zentralbl. Bacteriol, Mikrobiol. Hyg.1986; 19: 433.
157. Sánchez Ceballos F, Taxonera Samsó C, García Alonso C, Alba López C, Sainz de Los Terreros Soler L, Díaz-Rubio M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in the healthy population of Madrid (Spain). Rev Esp Enferm Dig. 2007; 99: 497 – 501.

158. Sanz-Pelaez O, Santana-Rodriguez E, Maroto AA, Carranza-Rodriguez C, Pisos-Alamo E, Perez-Arellano JL. *Helicobacter pylori* and *cagA* seroprevalence in sub-Saharan immigrants recently. Scand J Infect Dis. 2008; 40: 756 – 8.
159. Schlünzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath, and F. Franceschi. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. Nature 2001; 413: 814 – 21.
160. Schneider N, Krishna U, Romero-Gallo J, Israel D, Piazzuelo B, Camargo M, Sicinschi L, Schneider B, Correa P and Peek R. Role of *Helicobacter pylori* CagA Molecular Variants in induction of host phenotypes with carcinogenic potential. J Infect Dis. 2009; 199: 1218 – 21.
161. Shaikh S, Khaled MA, Islam A, Kurpad AV, Mahalanabis D. Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using 13C-urea breath test as a standard. J Pediatric gastroenterol Nutr 2005; 40: 552-4.
162. Sicinschi L, Correa P, Bravo L and Schneider B. A positive assay for identification of *cagA* negative strains of *Helicobacter pylori*. J Microbiol Meth. 2003; 55: 625 – 33.
163. Simala-Grant JL, Taylor DE. Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. APMIS 2004; 112: 886-97.
164. Skirrow M. B. *Campylobacter enteritis* “a new disease”. British Medical Journal. 1977; 2: 9 – 11.

165. Solnick JV, O'Rourke J, Lee A, Paster B, Dewhirst FE, Tompkins LS. An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *Infect Dis.* 1993; 168: 379 – 85.
166. Steer H.W. (1975) Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol.* 28: 639 – 646.
167. Steven J, Czinn MD *et al.* *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. *J Pediatr* 2005; 146: 21-26.
168. Stone G, Shortridge D, Versalovic J, Beyer J, Flamm R, Graham D, Ghoneim A, and Tanaka K. A PCR-Oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23 S RNAr gene mutations in Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1997; 41: 712 – 14.
169. Suerbaum, S., and P. Michetti. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 1175 – 86.
170. Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. Carcinogenic Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inducing Protein of *Helicobacter pylori* in Human Stomach. *BME.* 2006; 31: 1 – 8.
171. Sugimoto M and Yamaoka Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. *Arch Immunol Ther.* 2009; 57: 45 – 56.
172. Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum, and J. Sutcliffe. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44: 2118 – 25.

173. Tankovic J, Lascols C, Sculo Q et al. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3942–4.
174. Taylor D, Ge Z, Purych D, Lo T and Hiratsuka K. Cloning and Sequence Analysis of Two copies of a 23 S rRNA Gene from *Helicobacter pylori* and Association of Clarithromycin Resistance with 23S RNAr Mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 41: 2621 – 2628.
175. Thjodleifsson B, Asbjörnsdóttir H, Sigurjonsdóttir RB, Gíslason D, Olafsson I, Cook E, Gíslason T, Jogi R, Janson C. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* and *cagA* antibodies in Iceland, Estonia and Sweden. *Scand J Infect Dis*. 2007; 39: 683 – 9.
176. Torres LE, Melián K, Moreno A, Alonso J, Sabatier CA, Hernández M, Bermúdez L, Rodríguez BL. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 204 – 10.
177. Toshiro Fukui, Kazuichi Okazaki, Hiroyuki Tamaki *et al.* Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Laboratory Investigation* 2004; 84: 485–492.
178. Trajkow D, Stardelova K, Dimitrova M, Misheuski J, Serafimoski V. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma. *Prilozi*. 2007; 28: 25-38.
179. Tüzün Y, Bayan K, Yilmaz S, Dursun M, Ozekinci T. The prevalence of primary and secondary *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and probable

- contributing cofactors: data from southeastern Anatolia. *Hepatogastroenterology*. 2008; 55: 289 – 93.
180. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005; 280: 15390-15397.
181. Verlasovic J, Osato M, Spakovsky, Dore M, Reddy R, Stone G, Shortridge D, Flamm R, Tanaka D and Graham D. Point of mutations in the 23S rRNA gen of *Helicobacter pylori* associated with different levels of clarithromycin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 40: 283 – 86.
182. Wang G, Taylor DE. Site specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to macrolide-lincosamide-streptograminA antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 1952-8.
183. Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; 1273 – 75.
184. Weigt J, Malfertheiner P. Influence of *Helicobacter pylori* on gastric regulation of food intake *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009; 12: 522 - 5.
185. Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2009; 282; 1 -8.
186. Wirh H, Yang M, Sanabria-Valentin E, Berg D, Dubois A and Blaser MJ. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *FASEB J*. 2006; 20: 1534 – 36.



187. Wirth HP, Yang M, Peek R, Hook-Nikanne J, Fried M and Blaser MJ. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same host. J Clin Lab Med. 1999; 133: 488 – 500.
188. Woo HY, Park D, Park H, Kim M, Kim D, Kim IS. Dual Priming Oligonucleotide base multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with Gastric Biopsy Specimens. Helicobacter. 2009; 14: 22 – 28.
189. Yakoob J, Fan X, Hu G and Zhang Z. Genetic and phenotype changes following *in vitro* interactions between *Helicobacter pylori* strains. J Gastroenterol Hepatol. 2004; 19: 626 – 31.
190. Yamaoka Y, Kato M and Asaka M. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. Intern Med. 2008; 47: 1077 - 83.
191. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T *et al.* Distinct diversity of *vacA*, *cagA* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. J Clin Microbiol 2005; 43: 3906-16.
192. Yamazaki S, Kato S, Matsukura N, *et al.* Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive realtime PCR as a new diagnostic tool. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 4
193. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. World J Gastroenterol. 2008; 14: 4265 – 72.
194. Yang JC, Kuo CH, Wang HJ, Wang TC, Chang CS, Wang WC. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its

- association with *m1*, *m2*, or chimeric *vacA* middle types. Scand J Gastroenterol. 1998; 33: 1152 – 57.
195. Yokota S, Konno M, Mino E, Sato K, Takahashi M, Fujii N. Enhanced Fe ion-uptake activity in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with iron-deficiency anemia. Clin Infect Dis. 2008; 46: 31-3.

